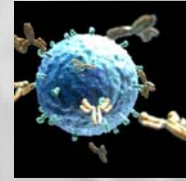
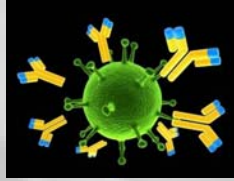
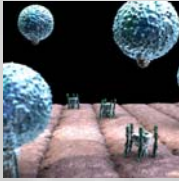
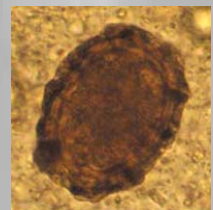
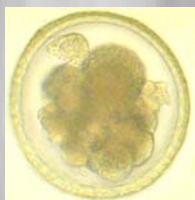


UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTADE DE VETERINARIA DE LUGO



**"SENSIBILIZACIÓN FRENTE A ANTÍGENOS DE
PARÁSITOS RESPONSABLES DE
HELMINTHOZONOSIS Y ARTRITIS REUMATOIDE"**



M^a CAROLINA DÍEZ MORRONDO

Lugo, marzo de 2011

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTADE DE VETERINARIA DE LUGO



**“SENSIBILIZACIÓN FRENTE A ANTÍGENOS DE
PARÁSITOS RESPONSABLES DE
HELMINTOZOONOSIS Y ARTRITIS REUMATOIDE”**

M^a CAROLINA DÍEZ MORRONDO

ISBN 978-84-9887-785-4 (Edición digital PDF)

DÑA. RITA SÁNCHEZ-ANDRADE FERNÁNDEZ, Profesora del Área de Sanidade Animal de la Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela,

DÑA. MARÍA SOL ARIAS VÁZQUEZ, Profesora del Área de Sanidade Animal de la Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela,

D. ADOLFO PAZ SILVA, Profesor del Área de Sanidade Animal de la Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.

INFORMAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “**SENSIBILIZACIÓN FRENTE A ANTÍGENOS DE PARÁSITOS RESPONSABLES DE HELMINTOZOONOSIS Y ARTRITIS REUMATOIDE**”, que presenta Dña. M^a CAROLINA DíEZ MORRONGO para optar al Título de Doctora en Medicina, ha sido realizada bajo la dirección conjunta de los abajo firmantes, y en su opinión reúne las condiciones legales precisas.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman en Lugo, a 21 de marzo de 2011.

Rita Sánchez-Andrade Fernández

María Sol Arias Vázquez

Adolfo Paz Silva

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han participado en la realización de este trabajo, y de manera muy especial:

A mis directores, que han sido mucho más que eso, a los Profesores Doctores Rita Sánchez-Andrade Fernández y Adolfo Paz Silva por haberme propuesto el tema de esta Tesis y por guiar mis primeros pasos en el inmunodiagnóstico de las infecciones parasitarias. A la Profesora Doctora María Sol Arias Vázquez por su dedicación, interés, afecto y cercanía. A los tres, muchas gracias, sin vuestra inestimable ayuda, ánimo, paciencia y confianza no hubiera sido posible la realización de esta Tesis.

A la Dra. Amalia Sánchez-Andrade Fernández, por sus orientaciones a la hora de elegir la especialidad de Reumatología, por sus continuos consejos en este campo y por su inestimable ayuda para poder disponer de parte del material de estudio necesario para la realización de esta Tesis.

Al Dr. José Luís Suárez García de Paredes, por su ayuda en la puesta a punto de las técnicas inmunoenzimáticas, por sus acertados consejos, su buen humor y su apoyo en todo momento.

A los Profesores Doctores Rosario Panadero Fontán, Ceferino López Sáñez y Pablo Díaz Fernández por la ayuda prestada siempre que fue necesario.

A los Doctores Ángel Romasanta Blanco y José Pedreira García, por su afecto y colaboración en las distintas fases de este estudio.

A los alumnos de Tercer Ciclo con los que inicié mi trabajo en el Laboratorio de Parasitología y Enfermedades Parasitarias de la Facultad de Veterinaria de Lugo, algunos ya son Doctores (Luis, Vicente e Iván) y otros espero y deseo que lo sean pronto (Adriana, Patricia, Sandra, Javier, Rubén y Pablo).

A todas las personas que trabajan en el Departamento de Patología Animal, por su ayuda durante los estudios de Tercer Ciclo, y muy especialmente a su Director, Profesor Dr. José Luis Benedito Castellote y a Doña Elena Somoza Fernández quienes, además de realizar la parte administrativa

necesaria para que esta Tesis saliera a la luz, siempre estuvieron pendientes de su realización.

A los integrantes del Servicio de Reumatología del Hospital Clínico Universitario de A Coruña, donde realicé mi especialización y sobre todo a las personas que han contribuido a mi formación, los Doctores Fausto Galdo Fernández, Javier de Toro Santos, José Antonio Pinto Tasende, Mercedes Freire Blanco, Antonio Atanes Sandoval, Genaro Graña Gil, Francisco Blanco García, Luis Fernández-Sueiro, Manuel Acauso Díaz, Carlos Fernández López, Natividad Oreiro Villar, Alejandro San Martín Álvarez; siempre estaré en deuda con vosotros por lo mucho que me enseñasteis, por la confianza que depositasteis en mi y por el cariño con que siempre me tratasteis. Tampoco puedo olvidarme de mis compañeros de residencia, Tomás, Cristina y Natalia “mis residentes mayores” y agradecer su ayuda, paciencia y comprensión; finalmente, quiero realizar una mención especial a José Manuel, Noe y Miguel, “los pequeños” y agradecer vuestra simpatía, amistad y las “estupendas experiencias” que compartí con vosotros, sabéis que siempre os recordaré.

A la Dra. Lucía Pantoja Zarza, Jefe del Servicio de Reumatología del Hospital del Bierzo, por la amabilidad con la que me recibió desde el primer día, por ayudarme a resolver las dudas que se me plantean en el día a día y sobre todo porque en muchas ocasiones, renuncia a asistir a diversos eventos para que yo me siga formando, gracias Lucía por ser tan excelente compañera. A D^a Teresa Fernández Rodríguez, por estar siempre pendiente de subsanar mis “despistes” y porque con su experiencia en el trato con los pacientes, y en especial por su excelente humor, que hace que el trabajo sea más agradable.

Y como no, quiero dedicar este trabajo a mis padres, por sus constantes ánimos y apoyo incondicional durante la Licenciatura, los años de MIR y la realización de esta Tesis; con su ejemplo, me enseñaron que con trabajo, dedicación y esfuerzo se pueden alcanzar muchas metas profesionales, no siempre fáciles de conseguir. Además, ellos y Nati “mi tía preferida”, desde su condición de veterinarios me hicieron comprender los importantes nexos de unión existentes entre el campo de la Medicina Humana y Veterinaria y que, como resume el lema de esta última “***Hygia pecoris, salus populi***”, que podríamos traducir como “la higiene de los animales garantiza la salud de las personas”.

ÍNDICE

	Pág
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
2.1. HELMINTOZOONOSIS	11
2.1.1. <i>Helmintos parásitos del hombre</i>	11
2.1.2. <i>Helminthozoonosis</i>	11
2.1.3. <i>Aspectos socioeconómicos de las helmintozoonosis</i>	13
2.1.4. <i>Respuesta inmunitaria frente a helmintos parásitos</i>	14
2.2. HELMINTOZOONOSIS EN ESTUDIO	16
2.2.1. <i>Toxocara canis y toxocariosis humana</i>	16
2.2.2. <i>Ascáridos y ascariosis visceral humana</i>	20
2.2.3. <i>Fasciola hepatica y fasciolosis humana</i>	26
2.3. DIAGNÓSTICO DE HELMINTOSIS EN PERSONAS	30
2.3.1. <i>Toxocariosis</i>	30
2.3.2. <i>Ascariosis</i>	32
2.3.3. <i>Fasciolosis</i>	34
2.4. PREVALENCIA Y FACTORES DE RIESGO DE HELMINTOZOONOSIS EN PERSONAS	36
2.4.1. <i>Toxocariosis</i>	36
2.4.2. <i>Ascariosis</i>	42
2.4.3. <i>Fasciolosis</i>	43
2.5. ARTRITIS REUMATOIDE	47
2.5.1. <i>Etiología de la AR</i>	49
2.5.2. <i>Patogenia de la AR</i>	51
2.5.3. <i>Autoanticuerpos en la AR</i>	54
2.6. DIAGNÓSTICO DE ARTRITIS REUMATOIDE	58
2.6.1. <i>Examen clínico</i>	58
2.6.2. <i>Laboratorial</i>	61
2.6.3. <i>Diagnóstico diferencial</i>	63
2.6.4. <i>Relación entre autoanticuerpos y AR</i>	64
2.7. AR Y FORMAS PARASITARIAS	68
2.8. HELMINTOSIS, INMUNIDAD Y TEORÍA DE LA HIGIENE	70

3. UNIDAD TEMÁTICA	75
4. PUBLICACIONES	83
4.1. <i>Toxocara canis</i> larvae viability after disinfectant-exposition	85
4.2. A case-control study to analyze the influence of the environment in human sensitization against helminth parasitic antigens	91
4.3. Relationship among presence of antibodies against <i>Ascaris suum</i> , eosinophilia and autoantibodies (IgM-RF)	99
4.4. Relationships between eosinophilia, anti- <i>Fasciola</i> IgG, and IgM rheumatoid factors, in urban and rural areas of north–western Spain	107
4.5. Helminth-sensitization in patients with rheumatoid arthritis	119
5. RESUMEN Y DISCUSIÓN	129
6. CONCLUSIONES	137
7. BIBLIOGRAFÍA	141



1. Introducción

Desde que el hombre domesticó al perro ambos han obtenido beneficio de esta relación: el perro proporciona compañía y seguridad a su propietario, que encuentra gran satisfacción emocional en la responsabilidad de cuidar no sólo de sus necesidades de alimento o cobijo, sino también de su salud (Endenburg y van Lith, 2010). Por este motivo, cada vez son más las experiencias agrupadas bajo el nombre común de *pet assisted therapy* que incluyen el cuidado de mascotas por parte de personas de edad, enfermos, etc., que experimentan una notable mejoría en sus funciones físicas, sociales, emocionales e incluso cognitivas (Zisselman *et al.*, 1996; Wensley, 2008). En un principio se emplearon fundamentalmente perros y gatos, y hoy en día se ha extendido a pájaros, roedores, caballos, llamas, reptiles, etc., y se denomina *animal assisted therapy*.

En las actividades relacionadas con la explotación ganadera de animales de renta también se establece un contacto estrecho con los animales, que han de recibir alimentación y cuidados precisos que garanticen un estado sanitario óptimo y con ello puedan proporcionar un rendimiento adecuado.

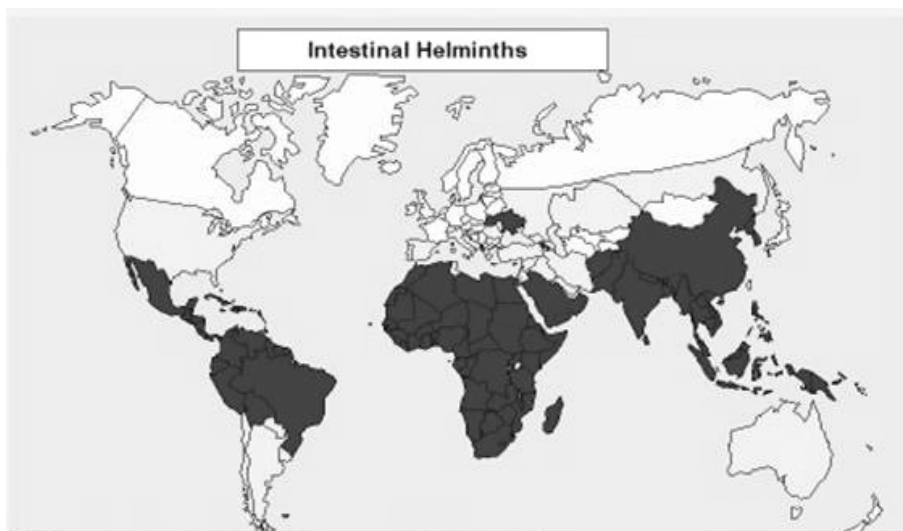
Las zoonosis son enfermedades transmisibles en condiciones naturales entre los animales y el hombre, para que el contagio se produzca es preciso que exista una alguna forma de contacto de estos con personas (Acha y Szyfres, 2003). Aunque la vía de infección más frecuente es la oral al ingerir alimentos o agua contaminados (carne, leche, huevos, agua) con diferentes formas patógenas (cisticercos, *Sarcocystis*, *Salmonella*, *Listeria*, etc.), existen zoonosis que necesitan en su transmisión de la intervención de vectores hematófagos, por ejemplo los flebótomos en el caso de la leishmaniosis o garrapatas en la enfermedad de Lyme, y otras en las que el contacto directo con el enfermo permite la transmisión de la infección (sarnas). En algunas zoonosis los patógenos infectan al hospedador de forma activa, por ejemplo penetrando por la piel en el caso de la esquistosomosis y de algunas filariosis.

Los problemas económicos y sociales que afectan a los países en vías de desarrollo condicionan la construcción de las infraestructuras necesarias para que la población disponga de agua potable y de canalizaciones para el tratamiento de las aguas residuales. Estos déficits condicionan el aumento de las enfermedades en general y de las zoonosis en particular. La aparición de zoonosis emergentes como el caso de la gripe aviar, la reemergencia de la tuberculosis y la leishmaniosis, así como el incremento de las zoonosis endémicas, no sólo constituyen un grave problema de salud pública, sino que también contribuyen al deterioro de estas economías poco saneadas al tratarse en muchos casos de enfermedades que reducen considerablemente la producción animal.

Las estrategias para el control de las zoonosis requieren la colaboración de profesiones de distintas especialidades, de veterinarios, médicos, biólogos, farmacéuticos, asistentes sociales, epidemiólogos, economistas, ingenieros, etc., que han de estudiar los factores que intervienen en la transmisión de las enfermedades, poniendo especial énfasis en el conocimiento de los reservorios de los agentes patógenos zoonóticos y en sus vías de difusión. En las regiones del mundo en las que los habitantes disponen de agua tratada, de servicios higiénicos y en los que existe inspección veterinaria de los alimentos, se reduce notablemente la exposición a los agentes patógenos procedentes de animales, y en consecuencia las enfermedades zoonóticas, independientemente de que el agente etiológico sea de origen infeccioso o parasitario.

Algunos helmintos causan zoonosis bien conocidas desde hace años (hidatidosis, fasciolosis, toxocariosis, ascariosis, etc.). Estos parásitos han evolucionado simultánea a la especie humana durante millones de años, periodos durante los cuales los parásitos han desarrollado estrategias extremadamente eficaces de adaptación que les llevan incluso a evadir las defensas de sus hospedadores, manteniendo de este modo su capacidad evolutiva.

Las helmintosis transmitidas por el suelo (toxocariosis, ascariosis) se sitúan entre las enfermedades infecciosas crónicas más prevalentes en las personas, aunque es difícil definir el número de personas infectadas y el deterioro económico que este grupo de patógenos provocan tanto de forma directa, al afectar la salud, como indirectamente al disminuir la producción de los animales infectados, Colley *et al.* (2001) estiman que hasta 2 billones de personas en el mundo están parasitadas por especies de helmintos. En el mapa siguiente se puede observar por ejemplo la distribución actual de las helmintosis intestinales en personas, que muestra que la población de los países subdesarrollados o en vías de desarrollo (en negro) tiene un alto riesgo de contagio, mientras que entre los habitantes de los países más avanzados (en gris), aunque se denuncian casos, se ha minimizado considerablemente su presencia.



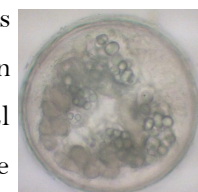
El perro (*Canis familiaris*) se encuentra estrechamente relacionado con el hombre y otros animales domésticos. Cuidar el estado sanitario de los perros, manteniendo además las pautas de vacunación y desparasitación correctas, evita que los perros se conviertan en diseminadores de estas infecciones zoonóticas.

La toxocariosis es una de las parasitosis más frecuentes de los perros, en especial de los cachorros, puesto que los animales adultos desarrollan una fuerte inmunidad frente a esta nematodosis. El hombre puede ingerir de forma accidental huevos embrionados de *T. canis*, que en su interior contienen una larva de segundo estadio (L 2), que es la fase infectiva para los hospedadores definitivos (perro) y los paraténicos (hombre y roedores). La ingestión accidental puede tener lugar al manipular tierra contaminada (parques públicos, areneros, etc.), al consumir vegetales crudos o insuficientemente cocinados que hayan entrado en contacto con heces de los perros infectados con hospedadores definitivos, a través de moscas que vehiculan en su patas huevos desde las heces de las heces de los animales e incluso con el agua corriente contaminada (Jiménez *et al.*, 1997). A pesar de que el parásito no llega a completar el ciclo en el hombre y las larvas no alcanzan el estadio adulto, sí pueden penetrar a través del intestino y realizar una emigración somática, durante la cual quedan retenidas son englobadas en los tejidos, lo que puede dar lugar al síndrome de **larva emigrante visceral** (LEV), o localizarse en el ojo, y producir el síndrome de **larva emigrante ocular** (LEO).



Ascaris lumbricoides es el agente etiológico de la ascariosis humana y *A. suum* de la porcina. El hombre puede ingerir de forma accidental huevos embrionados de *A. suum*, y de manera similar a lo descrito anteriormente para *T. canis* las larvas tampoco son capaces de terminar la migración y completar el ciclo, pero durante la emigración somática son englobadas en los tejidos, lo que puede dar lugar al síndrome de larva emigrante visceral (LEV). Aunque siempre se ha defendido la elevada especificidad de ambos ascáridos (*Ascaris lumbricoides* y *A. suum*), investigaciones recientes en niños que visitaban con frecuencia zonas rurales de Dinamarca han apuntado la posibilidad de que *A. suum* complete el ciclo y se transforme en adulto en las personas.

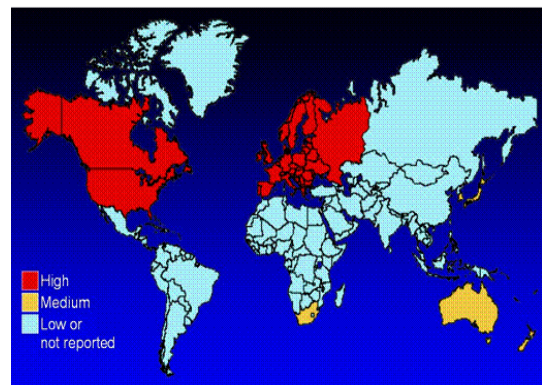
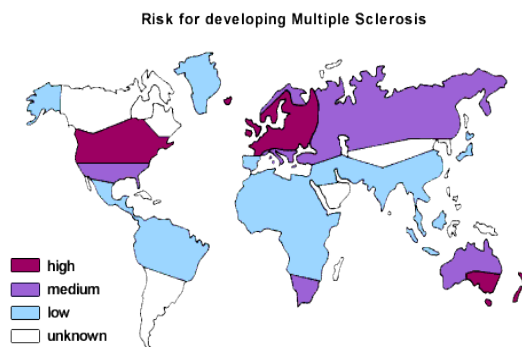
La fasciolosis (*Fasciola hepatica*) es una trematodosis frecuente en rumiantes que se mantienen en pastoreo en prados con zonas encharcadas. La infección en personas ocurre en áreas de carácter endémico para los animales. El hombre se infecta al ingerir algunas verduras (berros, canónigos, diente de león, etc.) con metacercarias, también al compartir acuíferos con animales con fasciolosis, e incluso en algunos países al beber jugos elaborados con agua y determinadas plantas a las que están adheridas las metacercarias.



Algunas investigaciones han señalado que la rápida modificación del medio y del estilo de vida en muchas áreas, no ha dado tiempo suficiente al sistema inmunitario de los seres humanos para adaptarse a nuevas situaciones y, aunque resulta imprescindible en la lucha frente a agentes infecciosos, esta falta de adaptación puede ser responsable de la aparición de fenómenos de autoinmunidad.

Desde hace varias décadas se ha comprobado un aumento de la frecuencia de algunas enfermedades autoinmunitarias como diabetes, Crohn, colitis ulcerosa, artritis reumatoide, etc., en poblaciones de países desarrollados, estableciéndose un gradiente decreciente de importancia Norte-Sur. Se trata de padecimientos que se caracterizan porque el sistema inmunitario *ataca* a un órgano, sistema, etc., propio porque es reconocido como extraño. En este proceso participan mecanismos celulares y humorales, y aunque también se ha descrito una predisposición genética, de origen poligénico, diversos estudios realizados en gemelos monocigóticos mostraron que los factores ambientales tienen suma importancia.

Al comparar los mapas que se representan a continuación con los de la distribución de las helmintosis en el mundo, se puede comprobar que mientras la incidencia de las parasitosis es máxima en los países menos desarrollados, la incidencia de **esclerosis múltiple** (izquierda) y de **colitis ulcerosa** (derecha) es más elevada en los países más ricos del hemisferio Norte.



Cada vez son más los investigadores que defienden la *hipótesis de la higiene*, que en un principio trataba de dar una explicación a la correlación inversa entre la incidencia de infecciones y el incremento de procesos alérgicos, y que posteriormente incorporó al estudio las enfermedades autoinmunitarias. En base a esta hipótesis, la infección por helmintos ejercería un efecto beneficioso sobre alteraciones de origen autoinmunitario, retrasando e impidiendo su aparición (Zaccone *et al.*, 2006).

Según Blanco *et al.* (2011), la artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica de origen desconocido, caracterizada por una poliartritis simétrica que afecta a pequeñas y grandes articulaciones, con tendencia a la cronicidad y evolución hacia la deformación y destrucción articular. La etiología es multifactorial, y requiere la interacción entre factores genéticos y estímulos antigénicos, que son probablemente exógenos y todavía desconocidos (Emery y Smolen, 1999).

La distribución de la AR es universal y tiene una gran repercusión socio-económica por afectar a una población que en su mayoría se encuentra en edad laboral; se estima que la prevalencia mundial se sitúa en torno al 0,8%, siendo su incidencia de aproximadamente 0,5/1.000 habitantes al año (Villaverde *et al.*, 2000). Las consecuencias que conlleva esta enfermedad, entre las que destacan diferentes grados de incapacidad laboral, es uno de los motivos que impulsan la utilización de nuevos tratamientos, entre los que se encuentran los denominados biológicos (Pinto *et al.*, 2010; Lema-Gontad *et al.*, 2010; Calvo *et al.*, 2010; Blanco *et al.*, 2011).

No se conoce el antígeno o antígenos que desencadenan la respuesta inflamatoria crónica en la artritis reumatoide. En general, se acepta que los factores iniciadores, presumiblemente infecciosos, inciden en individuos genéticamente predispuestos. Los factores genéticos actuarían además modulando la expresión de la gravedad o cronicidad de este proceso patológico (Majithia y Geraci, 2007).

Nielen *et al.* (2004), comprobaron la presencia de autoanticuerpos incluso 10 años antes de la constatación de la enfermedad clínica, lo que en su opinión sugiere la existencia de factores ambientales desencadenantes de la respuesta de autoanticuerpos que actúan mucho antes de la clínica de la enfermedad.

Teniendo en cuenta los antecedentes reseñados, en el presente trabajo nos hemos propuesto los siguientes **OBJETIVOS**:

- 1.- Analizar la capacidad de supervivencia de las formas infectivas de *Toxocara canis* expuestas a la acción de tres desinfectantes utilizados habitualmente en la limpieza de instalaciones en las que se mantienen perros u otros animales de compañía.
- 2.- Establecer en una población humana la seroprevalencia de anticuerpos frente a tres zoohelminthos parásitos, *Toxocara canis*, *Ascaris suum* y *Fasciola hepatica*, así como algunos factores que pueden influir en su aparición.
- 3.- Investigar las posibles relaciones entre la sensibilización frente a antígenos de *A. suum* y el desarrollo de eosinofilia y de factor reumatoide (FR-IgM).
- 4.- Verificar si el contacto con antígenos de *F. hepatica* está relacionado con la síntesis de autoanticuerpos (FR-IgM) en pacientes con eosinofilia.
- 5.- Estudiar la posible relación entre la exposición a antígenos de helmintos responsables de zoonosis (*A. suum* y *F. hepatica*) y la presencia de artritis reumatoide.

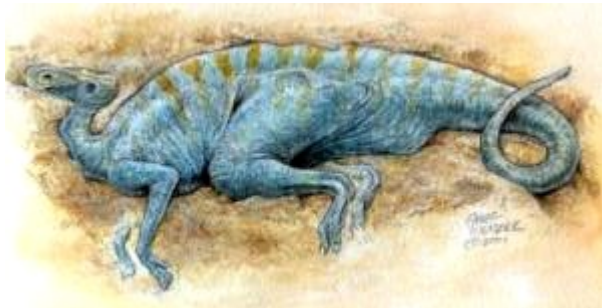


2. Revisión bibliográfica

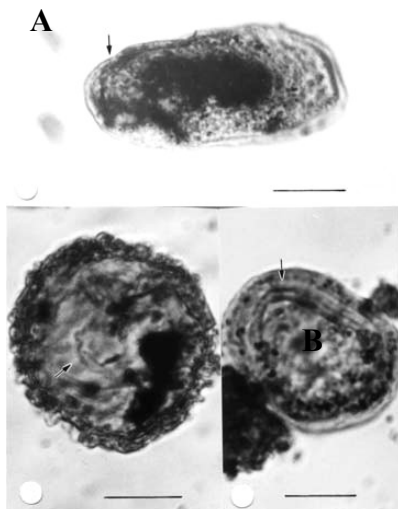
2.1. HELMINTOZOONOSIS

2.1.1. Helmintos parásitos del hombre

Estudios realizados por Poinar y Boucot (2006) indican que en el tiempo de los dinosaurios ya existían helmintos. El examen de restos humanos petrificados en el suelo de cuevas y la inspección de momias mostró que estos organismos han colonizado a las personas durante miles de



años, adaptándose las formas adultas a distintas localizaciones y sobreviviendo las fases larvarias en medios biológicos muy diferentes, a veces subsistiendo en el interior de hospedadores intermediarios, que abarcan desde caracoles para esquistosomas a moscas en el caso de filarias, y en otras ocasiones simplemente en el suelo o en el agua. La mayor parte son muy selectivos en la elección del hospedador, lo que testimonia la larga asociación entre parásito y hospedador.



Los helmintos parásitos son organismos metazoos que incluyen individuos muy diversos que pertenecen a Phyla lejanos filogenéticamente, Nematodos (gusanos redondos) (A) y Platelmintos (gusanos planos) (B). En el hombre pueden encontrarse bajo diferentes estadios, huevos, larvas o adultos. La vía de infección puede variar desde la infección oral (*Ascaris lumbricoides*) a la penetración directa a través de la piel (algunas especies de *Schistosoma*).

Algunos de los nematodos más comunes entre la población humana son *Ascaris lumbricoides*, *Necator americanus*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, *Strongyloides stercoralis* y las filarias como *Wuchereria bancrofti* y *Brugia malayi*. La mayoría de los gusanos redondos comunes (excluyendo las filarias) viven en el intestino (Rolff, 2007; Hotez *et al.*, 2008).

Existen dos clases de platelmintos, trematodos y cestodos. Los trematodos viven predominantemente en el sistema venoso (especies de esquistosoma), sistema biliar (*Clonorchis*, *Fasciola*), intestino (*Fasciolopsis*) o vías respiratorias (*Paragonimus*). Los cestodos en fase adulta se localizan en el intestino delgado del hospedador, como *Diphyllobothrium latum*, *Taenia saginata* y *Taenia solium*, mientras que los metacestodos tienen diferentes localizaciones en distintos órganos (hígado, pulmón, corazón, etc.).

Las helmintosis intestinales transmitidas por el suelo son indicadores de pobreza, de falta de higiene y de diseminación fecal. Continúan siendo las enfermedades infecciosas crónicas más prevalentes de las personas, con una estimación de 2 billones de personas infectadas en todo el mundo (Colley *et al.*, 2001). La OMS ha estimado que más de 1000 millones de personas en todo el mundo tienen infecciones simples o múltiples provocadas por *T. trichiura*, *A. lumbricoides*, y *N. americanus* y *Ancylostoma duodenalis* (OMS, 2001).

A diferencia de protozoos parásitos como *Plasmodium* spp. o *Leishmania* spp., que se multiplican en el organismo del hospedador provocándole una afección que se asemeja a una enfermedad infecciosa aguda, los helmintos adultos permanecen en número constante y su repercusión sobre la salud está íntimamente ligada a la carga parasitaria. El riesgo de mortalidad por helmintosis es muy bajo, pero a menudo presentan curso crónico y pueden causar enfermedad insidiosa o patente que conlleva morbilidad considerable (Hotez *et al.*, 2008). La asociación baja mortalidad y alta morbilidad puede ser uno de los motivos de la insuficiente aportación económica a la investigación y control de las helmintosis, lo que se ha traducido en la aparición de focos de enfermedades causadas por helmintos.

Los síntomas clínicos de infección sólo se manifiestan en los individuos muy parasitados (Symons, 1969; Bundy and Cooper, 1989; Grecis y Cooper, 1996; Albonico *et al.*, 1999). Sin embargo, también pueden aparecer en individuos moderadamente infectados, cuando concurren factores como mala alimentación, retraso del crecimiento y escaso nivel de educación (Callender *et al.*, 1992; Nokes *et al.*, 1992; Nokes y Bundy, 1994).

2.1.2. Helminthozoonosis

Se denominan así las infecciones provocadas por helmintos que son transmisibles entre los animales y el hombre en condiciones naturales. Los problemas económicos y sociales que han afectado a los países en vías de desarrollo en los últimos años, han provocado un serio incremento de las enfermedades en general y de las zoonosis en particular.

Las helmintozoonosis más frecuentes son la cisticercosis, la hidatidosis y la fasciolosis seguidas por la anisakiosis y trichinellosis. Estas enfermedades afectan tanto a las personas que viven en el ámbito urbano y periurbano como en el rural (Sánchez-Andrade, 2008). Existen otras zoonosis como la *larva migrans* cutánea provocada por *Toxocara canis* y *Ancylostoma caninum* y la *larva migrans visceralis* producida por *Toxocara canis*, y *Ascaris suum*, que son particularmente prevalentes en las poblaciones marginales de las áreas periurbanas y rurales de zonas desfavorecidas (Nejsum *et al.*, 2005).

Es importante destacar la aparición de zoonosis emergentes como la gripe aviar, la reemergencia de la tuberculosis y la leishmaniosis, así como el incremento de las zoonosis endémicas, porque constituyen actualmente un grave problema de salud pública. Por otra parte, se trata en muchos casos de enfermedades que tienen impacto en la economía por afectar tanto la producción animal como el comercio exterior, pues en algunas circunstancias son enfermedades transfronterizas.

2.1.3. Aspectos socioeconómicos de las helmintozoonosis

Los aspectos socioeconómicos juegan un papel preponderante en las enfermedades zoonóticas y muy particularmente en la difusión de las mismas. La incidencia y la prevalencia de las helmintozoonosis, al igual que para la mayoría de las enfermedades, se incrementa notoriamente con la mala nutrición y sobre todo con el escaso consumo de proteínas.

Las costumbres de las comunidades, la forma de crianza de los animales, hábitos alimentarios, niveles de educación, condiciones de pobreza y marginación social, disponibilidad de agua potable y sistemas sanitarios, se suman al complicado ciclo epidemiológico de este tipo de enfermedades (patogenia, hospedadores intermediarios, vectores, etc.) dificultando las alternativas de control.

Una de las causas del incremento de las zoonosis es el hacinamiento en el que viven mucho emigrantes en los alrededores de las grandes ciudades (Domenech *et al.*, 2006). No hay que olvidar, que aunque es un hecho marcadamente regional, sigue habiendo un porcentaje de habitantes de estas zonas periurbanas que hacen de la producción animal su medio de vida, en estos casos, existe una relación estrecha entre los animales y el hombre, que sumada a condiciones sanitarias precarias, provoca en dichas regiones el aumento de las posibilidades de contagio y el desarrollo de epidemias, (Gil y Sanmartino, 2002).

La cría de cerdos alimentados con basura o desperdicios de alimentos, es común en las zonas periurbanas de algunas ciudades de países en desarrollo, lo que propicia, junto con la proliferación de roedores, la diseminación de las zoonosis. La cría familiar o de subsistencia de porcinos, por ejemplo en Argentina, está asociada a la matanza domiciliar sin control de ninguna naturaleza, originando importantes brotes de triquinosis. Un hecho similar ocurre con la cisticercosis porcina que afecta tanto a Perú, Ecuador, Brasil y América Central (Bucardo *et al.*, 2005).

Sirva como reflexión la revisión realizada por Elliott *et al.* (2000), en la que se recuerda la frecuencia de las infecciones por helmintos en la población infantil y adulta de EEUU antes de los años 40, sobre todo entre los habitantes pobres de las ciudades y los granjeros del Sur.

En la actualidad, en EEUU las helmintosis se detectan de forma ocasional entre la población pobre que vive en las ciudades menos desarrolladas y entre inmigrantes recién llegados de países desfavorecidos.

Prácticamente no existen personas que se pueda decir que únicamente viven en la ciudad o en el campo, las posibilidades de desplazamiento provocan un fluido intercambio de personas y animales desde las ciudades hasta centros periurbanos y zonas rurales y viceversa, lo que incrementa y favorece los factores de riesgo necesarios para la difusión de las enfermedades. En algunas regiones de Dinamarca se ha detectado ascariosis en niños que visitan pueblos durante el fin de semana (Nejsun *et al.*, 2005). De otra parte, el notorio incremento de animales de compañía, y muy particularmente el de animales vagabundos expuestos a diversas zoonosis, les permite actuar como portadores y diseminadores de enfermedades (Gil y Sanmartino, 2002).

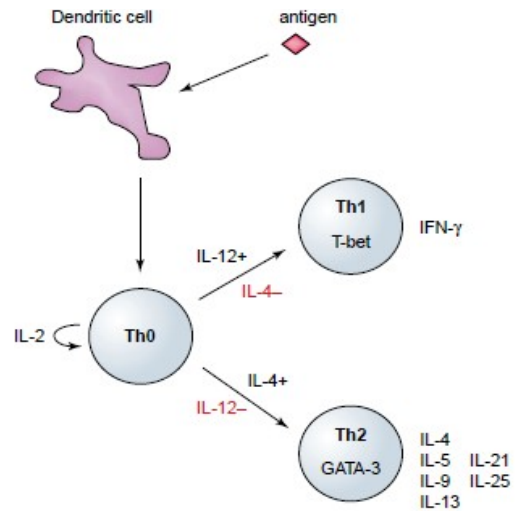
La modificación de las condiciones ecológicas por el hombre, como la quema de flora natural para introducir cultivos o la caza de animales silvestres depredadores, influye en la aparición de algunas enfermedades. Por ejemplo, la superpoblación de roedores en los alrededores de las ciudades, que previamente estaban en un equilibrio ecológico al ser controlados por felinos salvajes y aves de rapiña, influyen en la mayor cantidad de casos de enfermedades tales como leptospirosis o triquinosis (Gil y Sanmartino, 2002). En otras ocasiones, la reducción de poblaciones animales, hace que los agentes infecciosos busquen nuevos hospedadores y encuentren en los animales domésticos y el hombre el nicho apropiado para perpetuarse.

2.1.4. Respuesta inmunitaria frente a helmintos parásitos

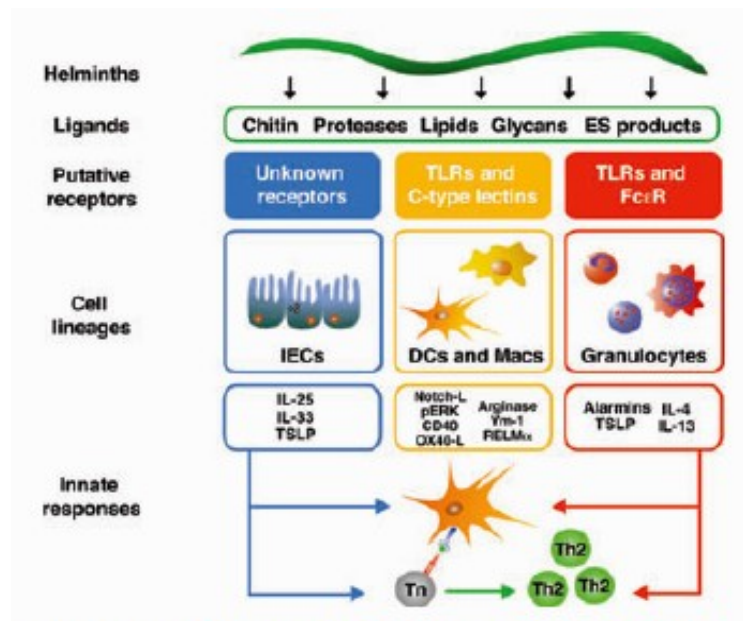
Anteriormente se ha citado que los helmintos parásitos se localizan en zonas como el lumen intestinal, conductos biliares o el torrente sanguíneo. Para ello, deben evadir y controlar el sistema inmunitario del hospedador. Esto se ha conseguido durante millones de años de coevolución, que ha brindado tiempo suficiente para que el parásito y su hospedador se ajusten gradualmente a esta relación.

Muchos parásitos parecen invencibles a las defensas humanas, posiblemente por su capacidad para percibir cambios hostiles en el medio local del hospedador, frente a los que son capaces de adaptarse. En ocasiones producen factores y receptores con homología con las moléculas del sistema inmunitario humano; en otras tienen una cubierta peculiar que puede absorber moléculas del hospedador y contribuir a evitar su detección por el hospedador.

Actualmente existe una opinión unánime acerca de que la infección por helmintos induce respuestas Th2, en las que las células T CD4 activas producen interleucinas (IL)-4, IL-5, IL-13 y un panel adicional de citocinas; todo esto está acompañado por el incremento de eosinófilos, basófilos, células cebadas y caliciformes, que participan y contribuyen a la respuesta (Nair *et al.*, 2006). En este apartado, las células B producen inmunoglobulina E (IgE) e IgG1.



La capacidad para inducir respuestas Th2 no parece ser una adaptación al parasitismo, puesto que helmintos de vida libre también poseen esta propiedad (Tawill *et al.*, 2004). Las respuestas Th2 ejercen un papel clave en la resistencia a helmintos (Nair *et al.*, 2006), pero también pueden ser inmunopatológicas (Gin, 2004). Su potencial patológico está infravalorado por el hecho de que desarrollan roles etiológicos en enfermedades prevalentes de sociedades occidentalizadas como alergias, asma y colitis ulcerosa.



Las células T CD4 no pueden reconocer directamente el antígeno, y requieren que sea procesado y presentado unido a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II en la superficie de células presentadoras de antígeno (Carvalho *et al.*, 2008). Existen relativamente pocos tipos celulares (células dendríticas, DC; macrófagos y células B, sobre todo) que presenten la capacidad de presentar complejos antígeno/MHC de clase II. Entre estos, las DC se consideran células con gran habilidad para activar células vírgenes y de este modo iniciar respuestas inmunitarias de adaptación.

2.2 HELMINTOZOONOSIS EN ESTUDIO

2.2.1. *Toxocara canis* y *toxocariosis humana*

a) Ciclo biológico

Toxocara canis (Werner, 1782) es un nematodo que pertenece a la Familia *Ascarididae* y que parasita el intestino delgado de carnívoros domésticos (perro, gato) o salvajes (lobo, zorro, lince o hurón). Los adultos son relativamente grandes, pudiendo llegar los machos hasta 10 cm de longitud por 2-2'5 mm de diámetro, y las hembras hasta 18 cm de largo y 2'5-8 mm de diámetro (Schmidt, 1992; Kassai, 1998).

Los huevos de *T. canis* son subglobulares y miden alrededor de 75-90 μm x 85-95 μm (Soulsby, 1987). La cubierta es gruesa, con varias capas concéntricas responsables de la protección del huevo frente a agentes físicos, químicos y ambientales (Morrondo *et al.*, 2006). En el interior contienen la célula huevo, globular, y no segmentada en el momento de la puesta. Las larvas infectivas o de segundo estadio (L2) se desarrollan en el interior de los huevos fértiles.

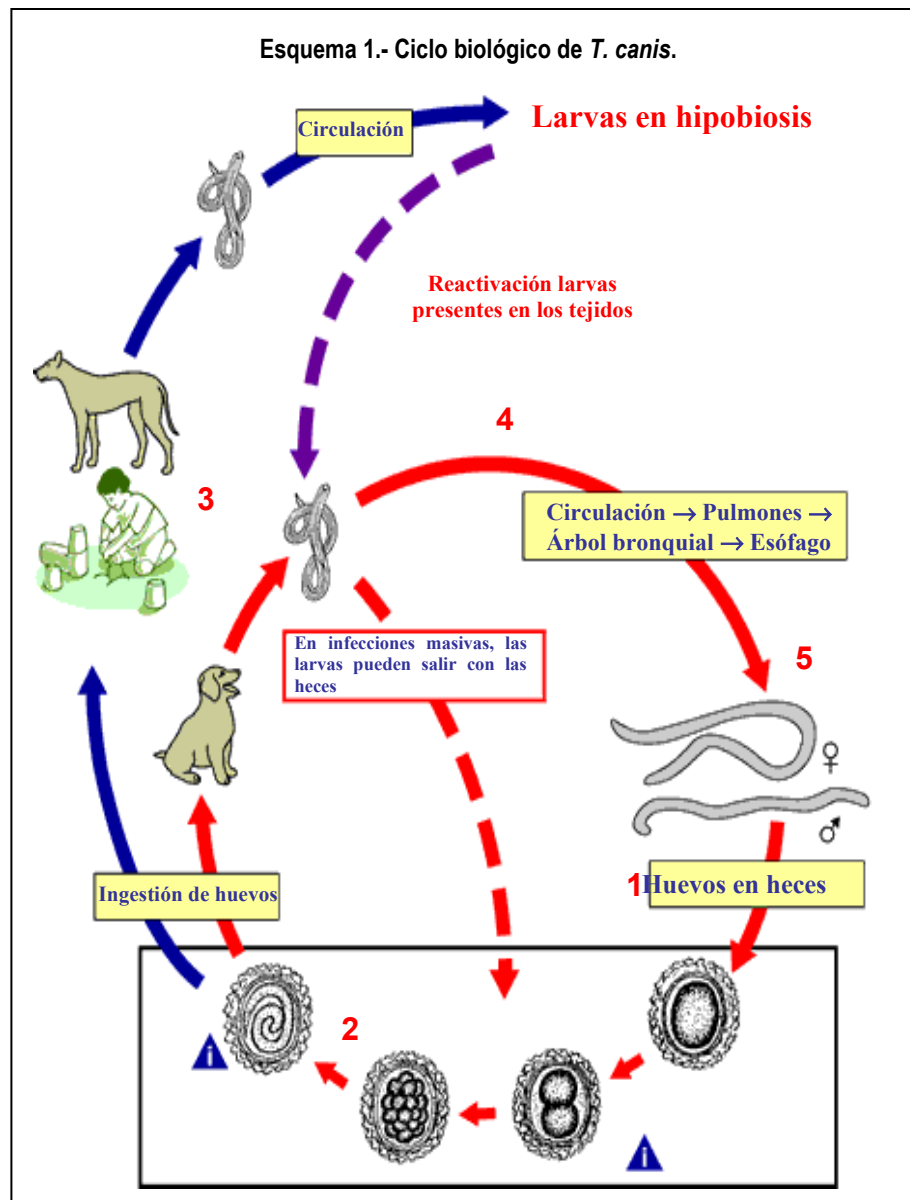


La toxocariosis se produce con mayor frecuencia en cachorros, puesto que los animales adultos desarrollan una fuerte inmunidad frente a esta nematodosis. La infección se puede producir por cuatro vías diferentes (Prieto *et al.*, 1995):

1. Oral, por la ingestión de huevos embrionados.
2. Por vía placentaria.
3. Transmisión galactógena.
4. Por ingestión de hospedadores paraténicos.

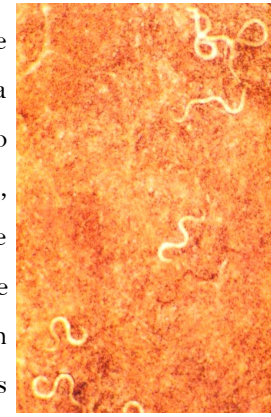
Como se puede observar en el esquema nº 1, el ciclo comienza con la eliminación de huevos con las heces de perros infectados (1), que en 5-9 días contienen una larva de primer estadio (Rubinsky-Elefant *et al.*, 2010). A las 2-5 semanas tiene lugar la primera muda, y aparecen las larvas 2 (2) o fases infectivas (Niedfeld *et al.*, 1993), que permanecen en el interior de los huevos hasta que son ingeridas por un hospedador, llegan al intestino delgado, se

liberan de las cubiertas del huevo (3) y penetran en las criptas de Lieberkhün, atravesando la mucosa y alcanzando los vasos linfáticos de la submucosa (Obwaller, *et al.*, 2001). A las 24-48 horas llegan al hígado por vía portal, donde algunas permanecen retenidas como consecuencia de reacciones inflamatorias, y otras continúan su migración hacia los pulmones a través de la vena cava posterior, corazón derecho y arteria pulmonar (4).



En cachorros menores de 5-6 semanas, la segunda muda ocurre en el pulmón entre 1 y 4 días post-infección, y se forman las larvas 3, que atraviesan la pared alveolar, son englobadas en mucosidades del árbol respiratorio y arrastradas hacia la faringe, desde donde pasan por deglución al aparato digestivo. Las dos mudas siguientes tienen lugar en el estómago y en el intestino (1 y 3 semanas post-infección). Las larvas 4 completan su desarrollo tras la última muda, alcanzando el estado adulto a las 3-5 semanas post-infección (5) (Rubinsky-Elefant *et al.*, 2010).

En perros mayores de 6 semanas, la mayoría de las larvas infectivas que llegan al pulmón no penetran en el árbol respiratorio, y continúan en la circulación y regresan al corazón por las venas pulmonares, siendo distribuidas por todo el organismo hacia distintos órganos y tejidos, como útero, glándula mamaria, musculatura estriada, riñón, etc., donde se detiene su desarrollo como **larvas somáticas** (Morrondo *et al.*, 2006), que desencadenan en el hospedador reacciones inflamatorias diversas. Smith (1991), basándose en estudios histológicos de ratones infectados experimentalmente con *T. canis*, sugirió que la elevada supervivencia de las larvas en la musculatura se puede deber a la invasión de células musculares, donde se sustraerían a la acción de la respuesta inmunitaria.



Las larvas acantonadas en el tejido muscular de las perras constituyen el principal reservorio de infección para los cachorros, puesto que la vía más fácil para la infección del perro es a través de la placenta (Burke y Roberson, 1985).

La longevidad media de los adultos de *Toxocara* no supera los 6 meses, y durante este periodo se eliminan diariamente miles de huevos en las heces del hospedador definitivo (Prieto, 1995).



Formas adultas de *T. canis* en el intestino de un perro.

b) *Toxocariosis humana*

El hombre puede ingerir de forma accidental huevos embrionados de *T. canis*, y aunque no se llega a completar el ciclo y las larvas no alcanzan el estadio adulto, pueden penetrar a través del intestino y realizar una emigración somática (Gillespie, 1993; Petithory *et al.*, 1994; Humbert *et al.*, 1995), durante la cual son englobadas en los tejidos, lo que puede dar lugar al síndrome de **larva emigrante visceral**

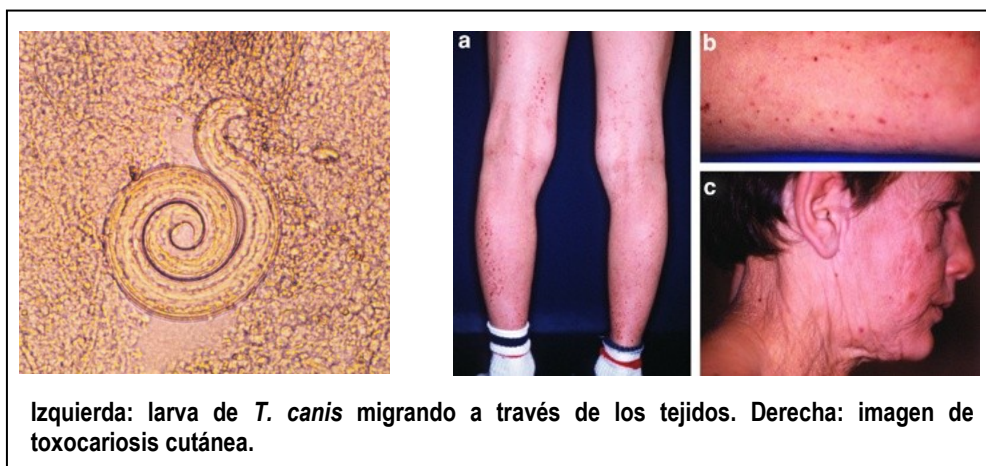


(LEV) (Glickman *et al.*, 1993; Geffray, 1999; Guay, 2001), o acantonarse en el ojo, y producir el síndrome de **larva emigrante ocular** (LEO) (Schneider *et al.*, 2000).

Aunque desde hace más de 30 años se sabe que *T. canis* puede provocar irritaciones y manifestaciones alérgicas pulmonares (Zacharasiewicz *et al.*, 2000), se han descrito otros cuadros clínicos de toxocariosis humana inespecíficos: neurológicos, oculares, pulmonares, cutáneos, reumatológicos y cardíacos (Zacharasiewicz *et al.*, 2000; Goffete *et al.*, 2000; Humbert *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2000; Degouy *et al.*, 2001).



Por todo esto, a las dos formas más comunes de presentación de la toxocariosis humana (visceral y ocular), algunos autores añaden la *toxocariosis encubierta*, que se correspondería con pacientes cuyo diagnóstico serológico resulta positivo y que cursa con algunos síntomas locales y sistémicos, pero no en forma de *larva migrans* ni de toxocariosis ocular (Nathwani *et al.*, 1992). Además, el 25% de los enfermos con toxocariosis encubierta no tienen eosinofilia. Magnaval *et al.* (2001) consideran que la forma encubierta aparece sólo en niños.



Pawlowski (2001) propuso un nuevo esquema de clasificación de las formas clínicas de toxocariosis humana, en la que diferencia la sistémica (*larva migrans*), compartimentalizada (ocular y neurológica), encubierta y asintomática. Para este autor, las manifestaciones clínicas en el hombre dependen del número de larvas y de su ubicación anatómica.

Numerosas citas asocian hipereosinofilia con infecciones parasitarias como la toxocariosis (Cancrini *et al.*, 1998; Kincekova *et al.*, 1999; Ajayi *et al.*, 2000; Demirci *et al.*, 2002; Goffette *et al.*, 2000). La eosinofilia en sangre periférica es proporcional a la eosinofilia hística, que se entiende como la reacción local a las larvas de *Toxocara* o a sus antígenos en los tejidos. Los eosinófilos son el componente más abundante en el infiltrado celular o granuloma, y el papel que juegan en la eliminación de las larvas de *Toxocara* es menos conocido que en otras parasitosis, probablemente debido al prolongado periodo de migración y también al desarrollo de mecanismos de evasión específicos (Kayes, 1997).

Acha y Szyfres (2003) indican que en todos los casos de toxocariosis humana se detecta hipereosinofilia persistente, pudiendo llegar el porcentaje de eosinófilos a superar el 50% del recuento total de leucocitos. A similar conclusión llegan Giacometti *et al.* (2000), señalando que existe relación entre la eosinofilia y la seroprevalencia de la toxocariosis humana, pero estos autores puntualizan que con frecuencia, los cuadros de eosinofilia elevada se presentan también con alta leucocitosis y existen muchas causas que elevan el recuento de leucocitos totales, por lo que éste parámetro aislado no es un buen marcador para la toxocariosis clínica.

Rugiero *et al.* (1995) comprobaron un caso de toxocariosis en el cual la eosinofilia se mantuvo durante 20 años, lo que sugiere también la persistencia prolongada de las larvas. Demirci *et al.* (2002) comprobaron que la seropositividad frente a *T. canis* y *F. hepatica* era más alta en pacientes con eosinofilia.

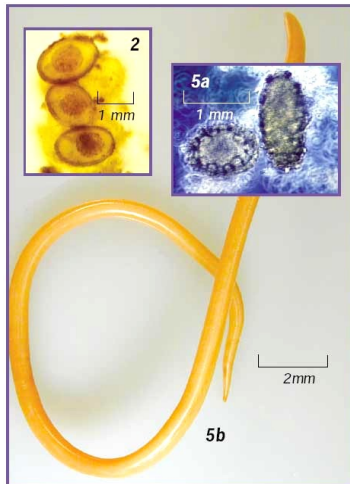
Algunas investigaciones han establecido que la toxocariosis humana cursa con otros **signos clínicos** como cefalea, disnea, dolor abdominal, erupciones cutáneas y manifestaciones oculares (Roldán *et al.*, 2010), y también hepatomegalia y alteraciones nerviosas (Espinoza *et al.*, 2010).

2.2.2. Ascáridos y ascariosis visceral humana

El agente etiológico de la ascariosis humana es *Ascaris lumbricoides* y el de los suidos *A. suum*. Ambas especies pueden infectar de modo ocasional al hospedador heterólogo y llegar a cierto grado de desarrollo.

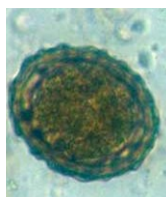
A. lumbricoides (Linneo, 1785) es un nematodo que pertenece a la Familia *Ascarididae*. Se estima que parasita alrededor de 1'4 billones de personas de regiones tropicales, subtropicales y templadas del mundo, lo que representa un grave problema de salud pública (Chan *et al.*, 1994; Crompton, 2001).

Tiene forma cilíndrica y color blanquecino amarillento o rosado, está recubierto externamente por una cutícula delgada y finamente estriada, compuesta en gran parte por lípidos. En el extremo anterior se encuentra la boca rodeada por tres labios finamente dentados que limitan la cavidad bucal pequeña y triangular, que se continúa con el esófago, que se comunica con el intestino; el recto desemboca en la cloaca sexual en el macho, y en el ano en la hembra.



El macho adulto mide de 15 a 30 cm y tiene un diámetro de 2 a 4 mm. La hembra adulta mide de 25 a 35 cm de longitud y tiene un diámetro de 3 a 6 mm. Los huevos no están embrionados en el momento de la puesta, se pueden observar dos tipos de huevos, los fecundados y los no fecundados. Los primeros encierran un cigoto que no llena por completo la cavidad, miden 70-75 x 60 μm , son ovalados, de cápsula gruesa y transparente formada por tres capas, la interna o membrana vitelina, de naturaleza lipóide, la media, derivada del glucógeno y la externa o albuminoidea con mamelones múltiples color café, debido a la impregnación en la misma de pigmentos biliares.

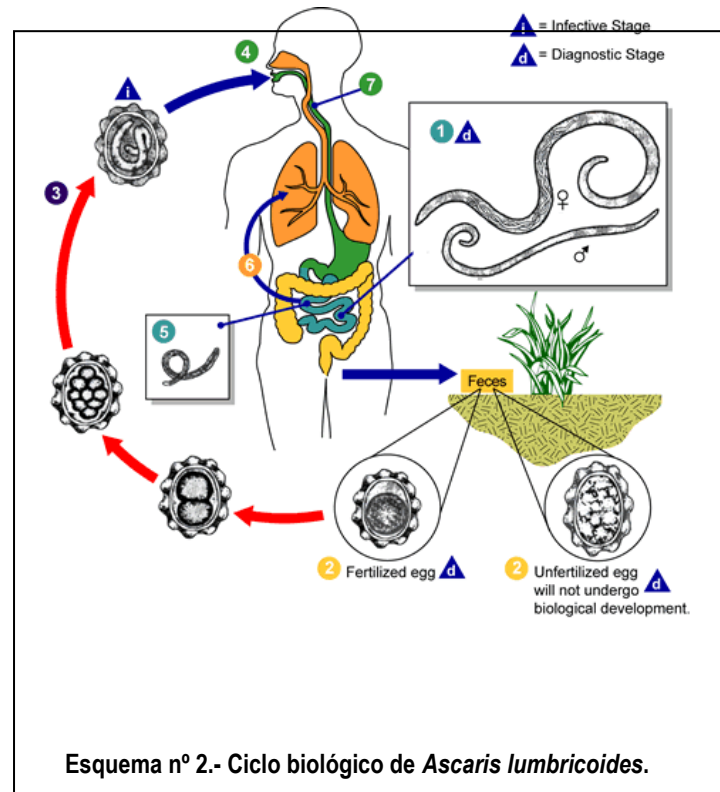
Los adultos de *A. suum* (Goez, 1782) parasitan el intestino delgado de cerdos y morfológicamente resultan idénticos a los adultos de *A. lumbricoides*. Como se observa en la imagen anexa, son de color blanco amarillento y relativamente grandes, 15-31 cm de longitud por 2-4 mm de diámetro (Soulsby, 1986).



Los huevos de *A. suum* son esféricos o ligeramente elipsoidales, miden alrededor de 60-75 μm x 50-55 μm ; en ellos se distinguen tres capas, la interna gruesa y transparente, está constituida por una membrana vitelina interna, relativamente impermeable y de naturaleza lipídica; la capa media es transparente y gruesa y una capa externa, mamelonada albuminoide y generalmente de color marrón dorado (Soulsby, 1986).

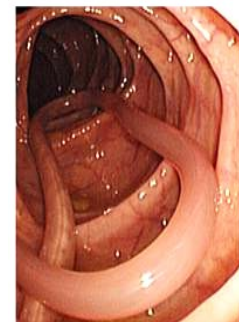
a) *Ascariosis humana. Ciclo biológico*

El ciclo evolutivo de *A. lumbricoides* es directo, y el hombre se infecta al ingerir huevos que contienen larvas infectivas (esquema nº 2). Los nematodos adultos se localizan en el intestino delgado de las personas y los huevos salen al exterior sin embrionar mezclados con las heces. En el ambiente externo, con temperaturas de 22-33°C, humedad, sombra y suelos arcillosos, los huevos evolucionan en 2-3 semanas hasta formar la larva de primer estadio, que muda a larva 2 dentro del huevo, fase infectiva para el siguiente hospedador.



Como sucede en la mayoría de los ascáridos, los huevos resisten bajas temperaturas, desecación, ácidos fuertes y formol; en suelos sembrados pueden permanecer infectivos entre 7 y 12 años (Habbari *et al.*, 1999). Una vez ingeridos, llegan al duodeno, son atacados por los jugos digestivos y liberan las larvas, que penetran en la mucosa duodenal, y a través de la vena porta llegan al hígado. Posteriormente, a través de la circulación pulmonar, continúan su migración hacia el corazón, pasan a los pulmones y a los capilares pulmonares, en donde quedan atrapadas.

En esta localización, las larvas rompen el endotelio capilar, penetran en los alvéolos, y ascienden por bronquiolos y bronquios a la faringe, donde son deglutidas, regresando al duodeno, donde completan su desarrollo y se diferencian en machos y hembras adultos (imagen adjunta). Después

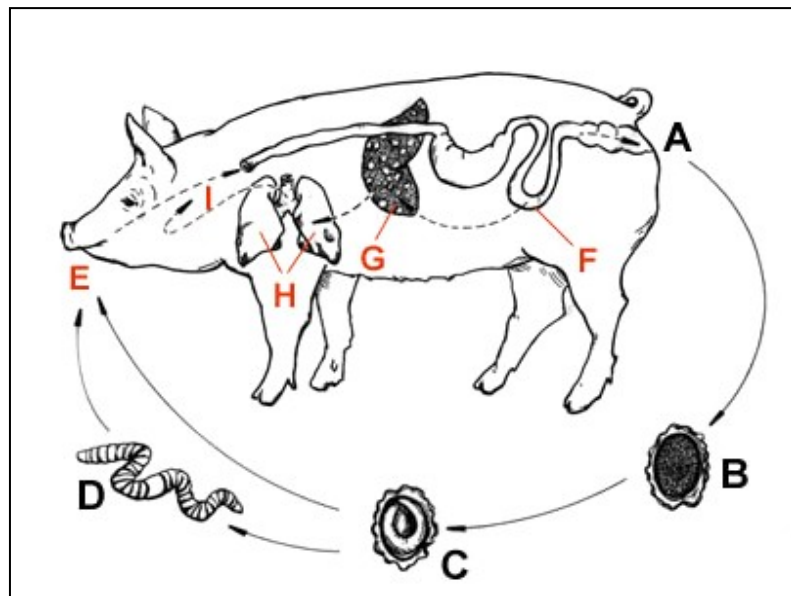


del acoplamiento, las hembras eliminan huevos (en número de 200.000 a 240.000 por día) aproximadamente 2 meses después de la infección.

La ascariosis humana (*A. lumbricoides*) es en muchos casos asintomática, sobre todo cuando son unos pocos adultos los que parasitan el tubo digestivo, si bien los efectos patógenos varían dependiendo de la localización del parásito a lo largo del ciclo intraorgánico. Los adultos provocan dolor abdominal, vómitos y en casos de infecciones intensas pueden llegar a producir obstrucción intestinal, del colédoco o conducto biliar, intranquilidad y alteración del sueño. Durante su migración, las fases larvarias provocan efectos patógenos fundamentalmente en las vías respiratorias, dando lugar a hemorragias e inflamación en los pulmones, que se traducen en síntomas como sibilancia, o dificultad para respirar. Cuando las larvas llegan a la glotis pueden producir sofocación o asfixia en los niños, haciendo más difícil la respiración.

b) *Ascariosis porcina. Ciclo biológico*

El ciclo biológico de *A. suum* se representa en el esquema nº 3. Las hembras adultas localizadas en el intestino del cerdo (F) eliminan hasta 1.000.000 de huevos por día, que son eliminados sin embrionar, mezclados con las heces del hospedador (A).



En condiciones ambientales favorables de temperatura y humedad, dentro del huevo se desarrolla la larva (B-C), que a las 3-4 semanas sufre la primera muda y se transforma dentro del huevo en larvas 2 que permanece en el interior del huevo como forma infectiva (D) (Cordero e Hidalgo, 2000; Urquhart *et al.*, 2001). Esta larva raramente eclosiona, y la infección tiene lugar mediante la ingestión de huevos infectivos que contaminan el agua de bebida, la comida, las instalaciones y las ubres de las madres.

Una vez en el intestino del cerdo (E), los huevos eclosionan y las larvas quedan libres (F), atraviesan la pared intestinal y a través de la vena porta o directamente por la cavidad peritoneal llegan al hígado (G). En el hígado, las larvas se desplazan provocando hemorragias y graves lesiones al destruir el tejido hepático. Dichas lesiones se presentan a modo de manchas blanquecinas, denominadas por su coloración “manchas de leche” (*milk spots*). Transcurridas 10-30 horas, y una vez que las larvas 3 han mudado de nuevo, recuperan la vía sanguínea para alcanzar el corazón y los pulmones a partir del 4º día post-infección (p.i) (H).



Las lesiones de las migraciones larvarias por los pulmones también son de naturaleza mecánica, y de nuevo las hemorragias focales iniciales dan lugar a hiperemia, edema e infiltración eosinofílica a medida que se desarrolla hipersensibilidad. En los cerdos jóvenes las lesiones pulmonares extensas causan insuficiencia respiratoria grave que puede llevar a la muerte del animal.

Desde los capilares pulmonares las larvas pueden ser transportadas a los tejidos por la vena cava caudal, corazón y arteria pulmonar, donde se transforman en larvas somáticas, otra posibilidad es que alcancen los alvéolos, desde donde ascienden por el árbol bronquial y la tráquea, llegan a la faringe con las secreciones bronquiales, que al ser deglutidas pasan al aparato digestivo (I).

Cuando llegan al intestino delgado (10-15 días pi), mudan de nuevo (L4) y alcanzan la madurez sexual, previa muda final (L5 a los 25-29 días pi). El ciclo completo dura entre 49 y 62 días (Nansen y Roepstorff, 1999). Algunas larvas regresan al corazón, desde los pulmones, distribuyéndose por diversos órganos, donde son eliminados por la formación de granulomas.

Los efectos patógenos causados por *A. suum* sobre el intestino delgado son menos espectaculares que los provocados por las migraciones larvarias. La ascariosis porcina provoca

diarrea, y ocasionalmente oclusión del conducto biliar o perforación de la pared intestinal. Los adultos pueden vivir más de un año.

c) *Ascariosis visceral humana*

El agente etiológico de la ascariosis humana es *Ascaris lumbricoides* y el de los suidos *A. suum*. Ambas especies pueden infectar de modo ocasional al hospedador heterólogo y llegar en él a cierto grado de desarrollo.

Para Crompton (1989) y Macko y Dubinsky (1997), *A. lumbricoides* y *A. suum* constituyen dos especies diferentes pero muy relacionadas, o pueden representar subpoblaciones de la misma especie

A. suum resulta idéntico morfológicamente a *Ascaris lumbricoides*, y podría ser el ancestro del parásito del hombre, al que habría pasado en tiempos prehistóricos, cuando el hombre inició la domesticación del cerdo (Crompton 1989, 2001).

Estudios realizados en Guatemala por Anderson *et al.* (1993) y en China por Peng *et al.* (1998) con ejemplares de áscaris eliminados por personas y cerdos demuestran que, en zonas en las que coexisten en el tiempo y en el espacio las dos infecciones, entre las dos especies no se produce intercambio genético. Esta especiación simpátrica sugiere para estos autores que los nematodos de los dos hospedadores pertenecen a taxones diferentes.

En la bibliografía se citan al menos dos infecciones experimentales en personas que mostraron que *A. suum* puede desarrollarse hasta el estado adulto en el hombre (Takata, 1951, Galvin, 1968). Aunque diversos estudios (Jaskoski, 1961; Crewe *et al.*, 1971; Lord y Bullock, 1982), indican que el ascárido del cerdo puede ser causa de zoonosis en áreas consideradas de baja prevalencia de ascariosis por *A. lumbricoides*, y que es excepcional que en el hombre, *A. suum* alcance el estado adulto, en general no pasa de las etapas larvarias y rara vez llega al intestino (Peng *et al.*, 2007). Hegggers *et al.* (1995) comprobaron que aunque existe la posibilidad de infección de las personas por *A. suum*, las larvas de origen porcino no llegan al estado adulto en el hombre.

En los últimos años, en Dinamarca, se detectaron varios casos de niños con ascariosis, que eliminaron después de ser tratados formas adultas de *Ascaris* sp. Al estudiar cual podía haber sido el foco de la infección, la epidemiología resultaba inexplicable si se aceptaba que el agente parasitario causante de la infección era *A. lumbricoides* (Astrup y Prag, 2001). Posteriormente, se confirmó que los niños infectados habían estado en contacto con cerdos o con su estiércol.

Nejsun *et al.* (2005) quisieron comprobar cuál era el agente etiológico de la ascariosis humana, en países desarrollados en los que la prevalencia de infección es mínima. Mediante

estudios genéticos del ADN de ascáridos adultos eliminados por personas, concluyeron que es posible que las personas se infecten al ingerir agua o alimentos contaminados con huevos embrionados de *A. suum* y que en los países desarrollados el contacto con cerdos supone un riesgo para la presentación de la ascariosis humana.

Según Peng *et al.* (1998) *A. lumbricoides* es morfológicamente idéntico a *A. suum*, y tiene especificidad por el hospedador, ya que mediante análisis de ADN mitocondrial se comprueba que los áscaris adultos hallados en personas que viven en ambientes contaminados por *A. suum*, han resultado ser *A. lumbricoides*. No obstante, estudios realizados con *A. suum* señalan que puede evolucionar en el hombre hasta las fases hepática y pulmonar, lo que se debe de tener presente ante algunas manifestaciones de padecimientos pulmonares en personas que conviven con cerdos infectados, en particular en niños.

El hombre puede ingerir de forma accidental huevos embrionados de *A. suum*, y aunque no llegue a completarse el ciclo, las larvas pueden penetrar a través del intestino y realizar una emigración somática (Inatomi *et al.*, 1999; Sakai *et al.*, 2006), durante la cual son englobadas en los tejidos, lo que puede dar lugar al síndrome de larva emigrante visceral (LEV) (Inatomi *et al.*, 1999; Hayashi *et al.*, 1999).

Este síndrome fue descrito por primera vez por Beaver *et al.* en 1952, como consecuencia de la ingestión de huevos embrionados de *T. canis*, posteriormente el síndrome de L.V.M., ha sido descrito en personas infectadas con huevos de *A. suum* (Phills *et al.*, 1972; Maruyama *et al.*, 1996; Sakakibara *et al.*, 2002). Escalante *et al.* (2005) consideran que la ascariosis intestinal está provocada por las formas adultas de *A. lumbricoides* mientras que la ascariosis pulmonar en las personas está relacionada con la ruptura de los capilares y de las paredes de los tabiques alveolares y puede ser producida por larvas de *A. lumbricoides* y de *A. suum*.

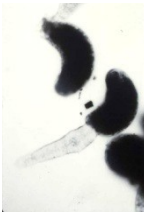
2.2.3. Fasciola hepática y fasciolosis humana

a) Ciclo biológico

F. hepática es un trematodo parásito de ciclo biológico indirecto, en el que participa un caracol anfibio (*Galba truncatula*) como hospedador intermediario, y que completa su ciclo en diversas especies de rumiantes, équidos, suidos, lagomorfos, roedores e incluso en personas (Sánchez-Andrade *et al.*, 2000).



Las formas adultas del trematodo se localizan en los conductos hepáticos y la vesícula biliar de los hospedadores definitivos, y su cuerpo está recubierto por una cutícula con pequeñas espinas dirigidas hacia atrás, que ejercen una acción irritante sobre los tejidos del hospedador durante su migración. Las fasciolas adultas eliminan huevos que salen al exterior sin embrionar, con las heces de los hospedadores definitivos.



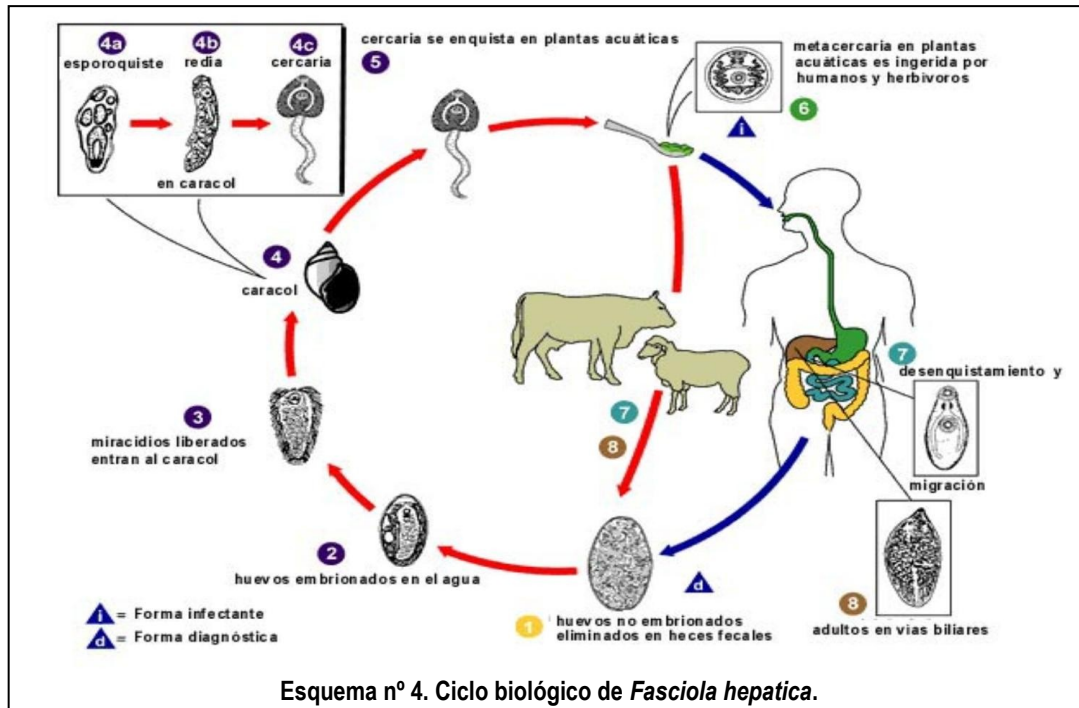
En presencia de condiciones ambientales favorables, en el interior del huevo se forma el miracidio, que eclosiona y nada activamente hasta encontrarse con un caracol de la especie *G. truncatula*, muy frecuente en Galicia, ya que prefiere zonas con predominio de terrenos encharcados o mal drenados (Morrondo *et al.*, 1995). Penetra a través del pie del caracol, hasta llegar al hepatopáncreas donde prosigue su evolución y se transforma en esporocisto; en su interior se forman las redias, dentro de las cuales se formarán las cercarias, que una vez maduras dejan el caracol y continúan su ciclo en el exterior, para lo cual necesitan un grado de humedad alto.

La cercaria se desplaza con su larga cola hasta que finalmente se fija a plantas u otros objetos presentes en el agua, pierde su cola, se enquista y se transforma en metacercaria, que ya será infectiva a las 24 horas de su formación. Su resistencia en el medio externo es muy alta, soportando mejor las condiciones del invierno que las del verano, debido a que el calor excesivo, la desecación y la luz directa del sol las hacen inviables pronto.



Una vez ingeridas por el hospedador definitivo, las metacercarias se desenquistan en el duodeno, atraviesan la pared intestinal, y al cabo de 2 horas, llegan a la cavidad abdominal, donde 24 horas después la mayor parte son ya formas juveniles. La emigración se realiza a través de la cavidad peritoneal, y a las 48 horas atraviesan la cápsula de Glisson y penetran en el tejido hepático hasta su asentamiento final en la luz de los conductos biliares.

A diferencia de las zoonosis parasitarias descritas con anterioridad, en el hombre se completa el ciclo intraorgánico de *F. hepatica*, lo que significa que los trematodos alcanzan el estadio adulto, la madurez sexual, y eliminan huevos que pasan a la bilis y después salen al exterior con las heces del hospedador (Marcos *et al.*, 2008).



b) *Fasciolosis humana*

Aunque tradicionalmente se ha tratado como una enfermedad propia de rumiantes, la fasciolosis se reconoce actualmente como una zoonosis emergente en la población humana. Antes del año 1992, el número de casos diagnosticados en el mundo era inferior a 3000. Recientemente se considera que entre 2'4 y 17 millones de personas padecen esta infección parasitaria, y que más de 91'1 millones viven en riesgo de infección (Keiser y Utzinger, 2005).

La infección en personas ocurre con frecuencia en áreas de carácter endémico para los animales. Se ha defendido que el origen de la trematodosis en pacientes humanos se debía a la ingestión de algunas verduras con metacercarias, en especial de berros (Rojo y Ferre, 1999), pero también se apunta a la posibilidad de compartir acuíferos con animales, a la utilización de utensilios de cocina insuficientemente limpiados (Mas-Coma *et al.*, 1999), e incluso a la ingestión de jugos elaborados con agua con metacercarias (Robinson y Dalton, 2009).

El cuadro patológico en el hombre es similar al que se describe en los rumiantes: las metacercarias llegan al intestino y se desinfectan, penetran en la mucosa del intestino provocando Petequias y focos de inflamación local. Una vez que atraviesan el peritoneo y alcanzan la cápsula de Glisson, migran a través del parénquima hepático provocando graves hemorragias e intensa lesión tisular. Finalmente, las fasciolas llegan a su localización definitiva, los conductos biliares.

La infección por *Fasciola* provoca en el hombre la aparición de dolor epigástrico, fiebre, eosinofilia, artralgia, mialgia, náuseas, pérdida de peso y prurito (Saba *et al.*, 2004). En opinión de algunos investigadores, en aquellos individuos que presentan eosinofilia de origen indeterminado se debería considerar la infección parasitaria como posible agente etiológico (Metter *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2003). Sin embargo, existe cierta controversia entre la infección por el trematodo *Fasciola* y el desarrollo de eosinofilia.

En un estudio desarrollado en pacientes de Turquía, Demirci *et al.* (2002) comprobaron que la fasciolosis humana y la eosinofilia guardaban cierta relación, puesto que el 8'9% de los casos con eosinofilia resultaron positivos a fasciolosis. En un trabajo posterior (Demirci *et al.*, 2003), observaron que los mayores porcentajes de fasciolosis aparecían en pacientes con eosinofilia, dado que de 756 casos con valores elevados de eosinófilos, el 6'1% resultaron positivos a la fasciolosis. Posteriormente, también en el mismo país, Turhan *et al.* (2006) encontraron que el 11'11% de los individuos seropositivos a *Fasciola* tenían eosinofilia.

Marcos *et al.* (2005) afirmaron que la eosinofilia se evidencia más en las primeras fases de la fasciolosis humana, ya que los pacientes con fasciolosis aguda tienen los valores medios de eosinofilia absoluta más elevados que los crónicos. Estas afirmaciones contradicen los resultados de Prociv *et al.* (1992), quienes afirmaron que esta zoonosis puede cursar sin eosinofilia.

2.3. DIAGNÓSTICO DE HELMINTOSIS EN PERSONAS

2.3.1. *Toxocariosis*

Directo

Resulta difícil en el hombre, ya que las larvas no completan su evolución hasta adultos, de modo que no existe eliminación de huevos y por ello no se pueden emplear técnicas coprológicas. En ocasiones se aplican técnicas de diagnóstico por imagen como ecografía, tomografía o resonancia magnética nuclear, que permiten apreciar en el hígado granulomas eosinofílicos compatibles con la presencia de larvas encapsuladas (Ishibashi *et al.*, 1992). Solamente se puede tener la certeza del diagnóstico cuando se observan larvas o sus restos por laparoscopia o al realizar la biopsia de nódulos hepáticos sospechosos (Rayes *et al.*, 1999) o en globos oculares enucleados (Wilder, 1950). En el interior de los nódulos se pueden encontrar granulomas parasitarios que suelen tener entre 0'1-1 cm de diámetro, color amarillento, a menudo umbilicados y rodeados de una zona necrótica, aunque no siempre hay larvas en su interior.



Serológico

Las dificultades para el diagnóstico directo de toxocariosis han estimulado el desarrollo de métodos de inmunodiagnóstico sensibles y específicos para la **detección de anticuerpos** en sangre u otros fluidos biológicos. Poco después de los trabajos de Wilder (1950) y Nichols (1956), que confirmaron que las larvas de *T. canis* eran el agente causante del síndrome de la *larva migrans*, distintos investigadores desarrollaron técnicas serológicas para su diagnóstico. Woodruff (1970) utilizó pruebas cutáneas, y Glickman *et al.* (1986) pusieron a punto un método basado en la inmunoprecipitación. Estas técnicas resultaron poco específicas, posiblemente porque emplearon antígenos somáticos complejos obtenidos de larvas o de toxocaras adultos.



Un avance decisivo en el diagnóstico de toxocariosis humana lo constituyó la puesta a punto de un método de mantenimiento *in vivo* de las larvas de *Toxocara* en el medio de cultivo celular RPMI 1640 (Savigny, 1975), que permitió utilizar como antígeno productos de excreción/secreción de larvas de segundo estadio (ESL2). Este antígeno es una mezcla compleja de glicoproteínas (como se aprecia en la imagen de la izquierda), algunas de ellas comunes a otras especies de *Toxocara* (*T. cati*, *T. vitulorum*, *T. pteropodis*), y en menor grado, con otros nematodos como *Anisakis*, *Ascaris* y *Toxascaris*, (Kennedy *et al.*, 1987, 1988; Page *et al.*, 1991; Cuéllar *et al.*, 1992; Loukas y Maizels, 1998; Romasanta *et al.*, 2003).

El ELISA con productos de excreción/secreción de larvas de segundo estadio (ESL2), es actualmente una prueba de elección para el diagnóstico de la toxocariosis. La presencia de valores considerados positivos de anticuerpos frente a los antígenos de *T. canis* (seropositividad) se estima un indicador de toxocariosis humana, y es patente en todos los tipos de toxocariosis, desde las formas asintomáticas hasta las más graves.

Para Jacquier *et al.* (1991) la sensibilidad del test utilizando un antígeno de ESL2, es buena (80-91%) y la especificidad adecuada (86%). Sin embargo, para otros autores, el mayor inconveniente radica en la existencia de fracciones antigénicas comunes con otros helmintos, fundamentalmente con *Strongyloides*, por lo que aconsejan que, al menos en pacientes procedentes de zonas tropicales, se tenga en cuenta la falta de especificidad del test (Polderman *et al.*, 1980; Welch *et al.*, 1983; Magnaval *et al.*, 1991).

Es importante tener en cuenta que la existencia de valores positivos de anticuerpos no indica necesariamente que el paciente padezca la enfermedad. Los falsos positivos pueden deberse entre otras causas a enfermedades ya superadas (Elefant *et al.*, 2006), o a reacciones cruzadas con otros parásitos helmintos, como *Strongyloides*, *Trichinella*, *Anisakis*, *Ascaris* y *Fasciola* (Romasanta *et al.*, 2003; Fan y Su 2004). Los falsos negativos son menos frecuentes, aunque pueden aparecer en infecciones muy recientes, o en las más antiguas, especialmente en casos de toxocariosis ocular, en los que es aconsejable realizar el inmunodiagnóstico a partir de muestras de humor vítreo o acuoso (Zarnowska-Prymek, 2001).

La duración media de la seropositividad obtenida con ELISA y un antígeno ESL2, en personas aparentemente sanas, es de 2-7 años (Jeanneret, 1991), aunque Fenoy *et al.* (1992) señalaron que no se pueden descartar nuevos contactos con el parásito en este tiempo. También hay que tener en cuenta que los títulos de anticuerpos no disminuyen de forma significativa e inmediata después del tratamiento antihelmíntico (Bass *et al.*, 1987; Matafiej *et al.*, 2001).

Con objeto de mejorar la fiabilidad de la técnica ELISA, se han utilizado como antígeno proteínas recombinantes, que mejoran la sensibilidad (Despommier, 2003) y la especificidad (Yamasaki *et al.*, 2000). En el mercado existen algunas pruebas de inmunodiagnóstico que valoran la respuesta anticuerpo IgG (Bordier Affinity, Francia) y las IgG e IgM (Novum Diagnostica, Alemania).

Los anticuerpos IgE producidos frente a *Toxocara* se detectan en el 54% de los casos de toxocariosis humana y son altamente específicos (Uhlíková y Hübner 1998). El nivel total de IgE es proporcional al de anticuerpos IgE específicos contra *T. canis*, resulta más elevado en

pacientes sintomáticos (35%) que en los asintomáticos (24%), y es directamente proporcional al de IgG (Pawłowski y Mizgajska, 2002). En personas con signos cutáneos de alergia relacionados con *Toxocara*, los niveles totales de IgE altos son más frecuentes que la eosinofilia (Uhliková, 1998; Magnaval *et al.*, 2001; Pinelli *et al.*, 2008).

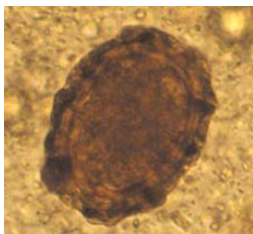
Para Nadler y Hudspeth (2000), la **detección de antígenos parasitarios** por inmunohistoquímica puede resultar útil cuando no es posible demostrar que existen larvas en los tejidos. Sin embargo, el riesgo que implica la biopsia, constituye una desventaja muy importante del método directo en el diagnóstico de la toxocariosis humana (Vanparijs *et al.*, 1991).

La determinación de la **presencia de antígeno en suero** puede ser más útil que el estudio de anticuerpos para estimar la duración de la enfermedad, ya que conlleva la presencia de larvas vivas y activas (Robertson *et al.*, 1988); la antigenemia en suero o en el fluido intraocular, acompañada de datos clínicos, ayuda a la valoración de los tratamientos (Cuéllar *et al.*, 1992, Zarnowska-Prymek, 2001). Iddawela *et al.* (2007) emplearon una prueba ELISA-sandwich con un anticuerpo monoclonal que reacciona con una proteína soluble de excreción/secreción de 57 kDa, que reduce los falsos positivos.

Luo *et al.* (1999) utilizaron un ELISA-sandwich para investigar la presencia de antígeno de *T. canis* en sueros de niños con síntomas compatibles con la infección, y aunque encontraron antígenos en parte de los sueros que tenían anticuerpos, comprobaron que la detección de antígenos mejoraba si se tratan los sueros positivos con polietilenglicol.

2.3.2. Ascariosis

Directo



Se emplea la técnica coprológica de flotación para observar la presencia de huevos del nematodo en pacientes infectados por *A. lumbricoides* (imagen adyacente). Este procedimiento no se puede aplicar a la detección de huevos de *A. suum* puesto que al igual que sucede con *T. canis*, las larvas no se transforman en adultos, y por ello no existe eliminación de huevos. De igual modo, el empleo de técnicas de diagnóstico por imagen puede apoyar el diagnóstico de esta helmintosis. Kakihara *et al.* (2004) estudiaron lesiones hepáticas producidas por larvas de *A. suum*, y comprobaron que el tamaño de las mismas oscilaba entre 3-35 mm de diámetro, apreciando que la mayor parte eran nodulares y una pequeña proporción

se encontraban incrustadas en el parénquima. Al realizar la biopsia, en el interior de los nódulos observaron una fuerte reacción eosinofílica que no siempre tenía larvas en su interior.

Ehrhard y Kernbaum (1979), después de realizar biopsias de 116 pacientes con síndrome de *larva migrans* visceral, siguiendo la descripción de Beaver *et al.* (1952), comprobaron que sólo 43 granulomas tenían larvas en su interior. En un estudio reciente, Musso *et al.* (2007) comprobaron, en autopsias de niños seropositivos a *A. suum*, que sólo el 3 '2% tenían granulomas parasitarios.

Serológico

Al igual que en el caso de la toxocariosis y por los mismos motivos, se han puesto a punto técnicas de inmunodiagnóstico sensibles y específicas para la comprobación laboratorial de la infección por *A. suum*.

Escalante *et al.* (2005) estudiaron la composición y poder antigénico de los antígenos somático y de ES de *A. suum*, y detectaron mayor número y mejor calidad de bandas en los antígenos de ES, por lo que consideran que resulta más aconsejable para el diagnóstico de la ascariosis.

El ELISA con productos de excreción/secreción de larvas de segundo estadio es actualmente la prueba de elección para el diagnóstico de la ascariosis. La presencia de valores considerados positivos de anticuerpos frente a los antígenos de *A. suum* (seropositividad) se estima un indicador de ascariosis humana, y es patente en todos los tipos de ascariosis, desde las formas asintomáticas hasta las más graves (Kennedy *et al.*, 1987; Andrade, *et al.*, 2005).

Nakamura-Uchiyama *et al.* (2006) estudiaron la respuesta IgG mediante ELISA en el suero de una mujer con sospecha de padecer una infección por helmintos y comprobaron que tenía un título alto de anticuerpos IgG frente al antígeno de excreción-secreción de *A. suum*, pero no frente al de *T. canis*, por lo que diagnosticaron síndrome de *larva migrans* causado por *A. suum*.

Osoegawa (2004) enfrentó suero y líquido cerebroespinal de siete pacientes con mielitis causada por *larva migrans* a antígenos de *A. suum* y *T. canis*. Mediante ELISA comprobó que el nivel de IgG frente a los dos antígenos era muy alto.

El uso de proteínas recombinantes ha mejorado la fiabilidad, la sensibilidad y la especificidad de la técnica ELISA (Yamasaki *et al.*, 2000). Existen algunas pruebas de inmodiagnóstico como el Kit múltiple dot-ELISA (SRL, Tokio) que detecta anti IgG frente a *T. canis* y a *A. suum* o el desarrollado por el Departamento de Parasitología, Myyazaki Medical

College, de Japón. Estos kits contienen 12 antígenos de diferentes parásitos incluido *A. suum*. (Maruyama *et al.*, 1996; Inoue *et al.*, 2002).

Numerosas citas asocian hipereosinofilia con infecciones parasitarias (Cancrini *et al.*, 1998; Kincekova *et al.*, 1999; Ajayi *et al.*, 2000; Goffette *et al.*, 2000; Demirci *et al.*, 2002).

Diversos autores (Phills *et al.*, 1972; Maruyama *et al.*, 1996) comprobaron que la migración larvaria a través de los órganos puede provocar infección pulmonar, alteración del hígado y eosinofilia. Para Sakai *et al.* (2006) en la infección humana por *A. suum* se comprueba infiltración eosinofílica pulmonar provocada como respuesta alérgica a la presencia y al metabolismo de las larvas.

La eosinofilia en sangre periférica es proporcional a la eosinofilia hística, que se entiende como la reacción local a las larvas o a sus antígenos en los tejidos. Los eosinófilos son el componente más abundante en el infiltrado celular o granuloma, y el papel que juegan en la eliminación de las larvas es menos conocido que en otras parasitosis, probablemente debido al prolongado periodo de migración y también al desarrollo de mecanismos de evasión específicos (Kayes, 1997).

Tokojima *et al.* (2004) no detectaron eosinofilia en sangre de una paciente con síndrome de LVM., causado por *A. suum*, pero en el fluido obtenido mediante lavado bronco pulmonar la proporción de eosinófilos era muy alta.

Cuatro estudiantes que de modo involuntario ingirieron con la comida gran número de huevos de *A. suum*, transcurridos 10 a 14 días presentaban infiltración pulmonar, eosinofilia, asma y un aumento de globulinas circulantes IgE, lo que indica el carácter alérgico de la enfermedad.

2.3.3. Fasciolosis

La fasciolosis humana cursa en la mayoría de los casos con un cuadro poco claro e inespecífico, en el que aparecen trastornos digestivos como diarrea o estreñimiento, ligera hipertermia, astenia, anemia y a veces ictericia y artralgias (Haseeb *et al.*, 2002). Por este motivo, es necesario recurrir al empleo de técnicas laboratoriales para su confirmación.

Directo



Teniendo en cuenta que en el hombre las fasciolas completan el ciclo biológico, es posible el diagnóstico mediante la técnica coprológica de sedimentación, basada en la demostración de huevos del parásito en heces (Hillyer *et al.*, 1992).

Este método tiene algunos inconvenientes, entre los que destaca que la detección de *Fasciola* sólo se consigue si los trematodos han alcanzado la forma adulta, y en esos casos ya se han producido las lesiones más importantes en el parénquima hepático (Sánchez-Andrade *et al.*, 2000). Otro aspecto a tener en cuenta es que la infección humana suele producirla un número pequeño de parásitos, de forma que la eliminación de huevos es reducida, pudiendo incluso pasar desapercibida (Hasseb *et al.*, 2003).

El diagnóstico mediante endoscopia retrógrada, muestra obstrucción de las vías biliares en la fase crónica de la infección y en ocasiones permite visualizar el parásito (Fullerton *et al.*, 2006).

Serológico

Las pruebas más extendidas para el diagnóstico de fasciolosis humana son las inmunoenzimáticas (ELISA), sobre todo las orientadas a la detección de anticuerpos específicos frente a antígenos de *F. hepatica* (Trueba *et al.*, 2000). Sin embargo, la existencia de reactividad cruzada frente a antígenos de otros helmintos parásitos puede complicar la interpretación de los resultados obtenidos frente a antígenos de excreción/secreción nativos (Sloan *et al.*, 1991; Nunes *et al.*, 1997; Lomba, 2001; Arias, 2001).

Para intentar soslayar este problema e incrementar la fiabilidad del ELISA en el diagnóstico de fasciolosis, se ha recurrido al empleo de diferentes proteínas recombinantes de *F. hepatica* (O'Neill *et al.*, 1998, 1999; Strauss *et al.*, 1999; Arias, 2007).

En otras investigaciones se han empleado con notable éxito algunas modificaciones de la técnica ELISA para la detección de antígenos circulantes (Espino *et al.*, 1998; Shehab *et al.*, 1999; Sánchez-Andrade *et al.*, 2002; Espinoza *et al.*, 2007).

Aunque no es un método usado habitualmente, es posible también confirmar la parasitación, realizando PCR en la bilis obtenida mediante aspiración por endoscopia (El *et al.*, 2006).

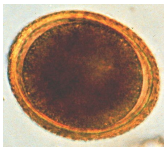
2.4. PREVALENCIA Y FACTORES DE RIESGO DE HELMINTOZOONOSIS EN PERSONAS

2.4.1. Toxocariosis

La presencia del perro o del gato juega un importante papel epidemiológico en el desarrollo del síndrome de *larva migrans*, pero el contacto estrecho con estas mascotas no entraña un riesgo especial para contraer la enfermedad, ya que la embrionación de los huevos, para que resulten infectivos requiere como mínimo 2 semanas en el ambiente, por lo que el contacto con tierra contaminada y la falta de higiene resultan



factores primordiales (Overgaauw, 1997). El manejo de animales parasitados no siempre supone un mayor riesgo de adquisición de la infección. Baixench *et al.* (1992) y Herrmann *et al.* (1985) comprobaron que profesionales veterinarios y limpiadores de caniles mostraban seroprevalencias similares a las de la población general. Sin embargo Chiodo *et al.* (2006) en un estudio en Argentina, señalaron que todos los individuos seropositivos eran dueños de perros, lo que coincide con las observaciones de Prestes-Carneiro *et al.* (2009), Espinoza *et al.* (2010) y Jarosz *et al.* (2010), quienes afirmaron que la posesión de mascotas era un factor de riesgo para el desarrollo de toxocariosis humana.



Debido a la resistencia de los huevos de *T. canis* a algunas condiciones adversas (agentes físicos, químicos y mecánicos) (Korsholm, 1982; Bouchet y Leger, 1983; Morrondo *et al.*, 2006), su supervivencia en el ambiente es elevada y representa una fuente de infección constante. Fillaux *et al.* (2007) indicaron que el clima de la Patagonia (Argentina) era desfavorable para el desarrollo de los huevos de *T. canis*, lo que explicaba que pese a detectarse un porcentaje elevado de contaminación de los suelos, la prevalencia de la nematodosis entre la población humana era del 31'6%.

Tradicionalmente se admite que la población infantil es el principal grupo de riesgo a padecer la infección, debido a hábitos de *geofagia* y a cierta inmadurez inmunológica en los niños (Baboolal y Rawlins, 2002; Roldán *et al.*, 2010; Espinoza *et al.*, 2010). Mediante **análisis de tierra de jardines y parques públicos**, se ha demostrado la presencia de huevos de ascáridos, en muchos casos ya



embrionados. En más del 50% de parques públicos de Madrid, Angulo *et al.* (1987), comprobaron la presencia de huevos de ascáridos caninos. Asimismo, en el 3'7%, de los parques de la ciudad de Salamanca se encontraron huevos de *T. canis*, porcentaje que se elevó al 9% en

poblaciones rurales de la misma provincia (Conde *et al.*, 1989). Toledo *et al.* (1994) observaron que el 28% de las muestras de suelo de parques de Tenerife contenían huevos de *T. canis*. y que el 85'2% de los lugares de recreo estaban contaminados por distintas formas parasitas, destacando la presencia de huevos de *T. canis* en el 37% de las muestras analizadas.

En algunos estados del Brasil como Paraná o São Paulo, se han recogido formas infectivas del parásito en más del 40% de las muestras de suelo procesadas (Prestes-Carneiro *et al.*, 2009; Colli *et al.*, 2010). Estos resultados contrastan con los de Jarosz *et al.* (2010) en Polonia y Akdemir (2010) en Turquía (10%), y apuntan hacia la idoneidad de ambientes tropicales o subtropicales para la supervivencia de los huevos de *Toxocara*. Esto podría servir de explicación a los elevados valores de seroprevalencia de toxocariosis humana detectados en las localizaciones sudamericanas (51%).

La contaminación de espacios de recreo con huevos embrionados de *Toxocara* parece ser para Lalosevi *et al.* (2001) el indicador más directo del riesgo de LEV humana. Van Knapen *et al.* (1992) propusieron evitar la fertilización de los parques públicos con abonos orgánicos en los que existe la posibilidad de vehicular formas parasitarias que resisten procesos de depuración y de compostaje (Thomaz-Soccol *et al.*, 1999).

El contagio por medio de los **alimentos** constituye un aspecto poco conocido en la epidemiología de la toxocariosis. Se ha demostrado que el consumo de algunos alimentos crudos o mal cocinados y su manipulación bajo escasas condiciones higiénicas constituyen un importante foco de agentes parasitarios y en particular de *T. canis*



(Oliveira *et al.*, 1992; Magnaval *et al.*, 1994; Vázquez-Tsuji *et al.*, 1997; Comi *et al.*, 2000). Romeu *et al.* (1991) confirmaron un caso de toxocariosis humana en España, en el que comprobaron que los caracoles actuaban como hospedadores paraténicos.

En algunas investigaciones se ha señalado que el **agua** es el factor de mayor importancia en la diseminación de la infección por *T. canis* en las grandes urbes (Beer *et al.*, 1999; Radman *et al.*, 2000).

Se ha sugerido la **intervención de pequeños mamíferos** como reservorios de *T. canis*, actuando como hospedadores paraténicos que mantienen focos de esta parasitosis fundamentalmente en áreas urbanas (Petithory *et al.*, 1994; Dubinsky *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1999).

Desde el punto de vista del **transporte pasivo**, la mosca juega un importante papel como vector mecánico, ya que puede transportar huevos del nematodo en sus patas, y contaminar alimentos que después consume el hombre, o incluso el propio perro que interviene como hospedador final. (Pegg, 1971; Umeche *et al.*, 1991).



Aunque se han realizado estudios con individuos de distintos grupos de **edad**, no se ha llegado a resultados concluyentes, determinándose que los niños constituyen el principal grupo de riesgo. Mediante ELISA, Fenoy *et al.* (1996) desarrollaron un estudio epidemiológico en niños sanos de Madrid y Canarias, y comprobaron que el 0% y el 4'2% respectivamente eran seropositivos; estos porcentajes resultaron del 3'6% en Madrid y el 17'4% en Canarias en personas adultas. Los mismos autores analizaron 170 sueros, remitidos desde el laboratorio del hospital Juan Canalejo de A Coruña, con síntomas clínicos compatibles con esta parasitosis, y encontraron que el 23'3% de los sueros de adultos, el 32'8% de niños y el 17'7% con edad desconocida eran positivos por ELISA (Fenoy *et al.*, 1997).

Para determinar si la seroprevalencia de la toxocariosis humana estaba relacionada con la edad y el ambiente socioeconómico, Cilla *et al.* (1996) realizaron un estudio en niños de Guipúzcoa, y comprobaron que en los de clase social media y con edades comprendidas entre 2-5 y 6-16 años la seroprevalencia oscilaba entre el 0% y 4'4%, respectivamente, mientras que en niños de ambientes desfavorecidos los porcentajes de positividad aumentaban hasta el 37% y 64% para los mismos grupos de edad.

Jiménez *et al.* (1997) comprobaron que el 3'45% de la población de las Islas Canarias presentaba títulos positivos de anticuerpos frente a *T. canis*, sin apreciar diferencias significativas con la edad; por el contrario, al considerar la procedencia de los sueros, observaron que la prevalencia variaba entre el 2'5% en las islas del sur y el 6'7% en las del norte del archipiélago.

Buijs (1997) estimó la seroprevalencia de la toxocarosis humana en Holanda en aproximadamente el 8% en niños y el 20% en adultos. El porcentaje de seropositividad en la población infantil del norte de Irán resultó del 25%.

Numerosas investigaciones han relacionado la presencia de algunos **signos clínicos** y la presencia de anticuerpos frente a *T. canis*. Portus *et al.* (1989) comprobaron que el 3'6% de sueros de pacientes de Barcelona eran positivos, y que este valor aumentaba hasta el 14'1% en personas con eosinofilia.

En Francia, Gueglio y Marjolet (1991) demostraron anticuerpos anti-*Toxocara* en el 25% de las muestras séricas de adultos sanos. En un estudio posterior, Gueglio *et al.* (1994) comprobaron que, en pacientes con eosinofilia procedentes de la región del Loira (Francia), el 22% eran seropositivos y el 7% muy positivos.

Guerra *et al.* (1995) constataron mediante un estudio epidemiológico, que el 1% de los niños de Madrid con hipereosinofilia tenían títulos elevados de anticuerpos frente a *T. canis*.

El 39% de los niños hospitalizados por distinto motivos en el estado de Espíritu Santo (Brasil) tenían toxocariosis (Moreira Silva *et al.*, 1998), y el 25'5% de los niños entre 6 y 59 meses de la Amazonía eran seropositivos (Ferreira *et al.*, 2007), porcentaje muy superior al 5'2% encontrado en niños sanos de La Habana (Montalvo *et al.*, 1994).

En el norte de la India la seroprevalencia estimada por Malla *et al.* (2002) fue del 6'4% en individuos sanos, y del 23'3% en pacientes con síntomas clínicos compatibles con toxocariosis.

Prestes-Carneiro *et al.* (2009) comprobaron que el 13'7% de una muestra de pacientes del estado de São Paulo (Brasil) resultaban positivos al ELISA y antígenos de excreción/secreción de larvas 2 de *T. canis*, de los que el 38% mostraban manifestaciones oculares.

En un estudio realizado en una ciudad de la Amazonia peruana, Roldán *et al.* (2010) mostraron que la seroprevalencia de toxocariosis humana alcanzaba el 35%, de los que el 95% presentaban cefalea, disnea, dolor abdominal, erupciones cutáneas y manifestaciones oculares.

Espinoza *et al.* (2010) llevaron a cabo un estudio con personas de tres comunidades andinas y observaron que en el 20% de los casos había títulos positivos de anticuerpos frente a *T. canis*, que cursaba con disnea, hepatomegalia, trastornos oculares, dolor abdominal, alteraciones nerviosas y cutáneas.

La seroprevalencia de toxocariosis entre niños de Croacia con eosinofilia fue del 31% (Sviben *et al.*, 2009).

En diversos estudios se ha planteado que además de la **edad** de los pacientes, su **hábitat**, **condición socio-económica** o su **profesión** pueden ser factores que influyen notablemente en la prevalencia de esta parasitosis (Cilla *et al.*, 1996; Baboolal y Rawlins, 2002).

Tradicionalmente se creía que en las áreas rurales había mayor riesgo de adquirir la infección (Uhlikova y Hubner, 1998), pero en distintos estudios se ha comprobado que la toxocariosis es más frecuente en el ambiente urbano (Fok *et al.*, 1999; Sadjjadi *et al.*, 2000).

Conde *et al.* (1989) en la provincia de Salamanca, encontraron mayor seroprevalencia (8'5%) en personas de zonas urbanas respecto del medio rural (4'6%); estos resultados se contradicen con lo citado por Zwoliński (2000) que encontró mayor seroprevalencia en personas de ámbito rural, y menor en habitantes de casas y pisos de las ciudades de la región de Lublin (Polonia).

En otros países europeos se han obtenido resultados similares. En Suecia, Ljungdström y van Knapen (1989) observaron que el 5% de adultos sanos de las ciudades y el 17% de personas de hábitat rural presentaban anticuerpos frente a *T. canis*. En Hungría, Uhlikova y Hubner (1998) encontraron variaciones apreciables entre el 5'8% del medio urbano y el 36'05% en la población rural.

Lapinski *et al.* (2000) comprobaron que el 12% de los trabajadores del parque nacional de Bialowieza (Polonia) eran seropositivos a *T. canis*. Al ampliar el estudio con otros trabajadores de la zona, destacaron que el trabajo en el mencionado parque natural no presupone un factor de riesgo para adquirir la infección. En Austria, se comprobó mediante ELISA que el 33% de los veterinarios eran seropositivos a *Toxocara* (Deutz *et al.*, 2005).

La toxocariosis en Argentina representa un problema de salud pública, ya que el 37'9% de niños entre 1-14 años de edad en aparente buen estado y el 39'9% de adultos donantes de sangre resultaron seropositivos a *Toxocara* (Alonso *et al.*, 2006). En estudios anteriores estos mismos autores (Alonso *et al.*, 2000) alertaron sobre la elevada prevalencia (70%) en niños que convivían con perros en las casas.

Jarosz *et al.* (2010) desarrollaron un estudio entre estudiantes de zonas rurales de Polonia, y demostraron que el 14'5% eran positivos mediante ELISA.

El **estatus socio-económico** resulta un factor epidemiológico decisivo. Herrman *et al.* (1985) detectaron que los niveles medios de positividad oscilaban entre 4'6 y 7'8% en niños americanos de raza blanca, mientras que en los de raza negra, con bajo nivel socio-económico y cultural, la prevalencia aumentaba hasta el 30%.

En países en los que las condiciones climáticas favorecen el ciclo externo de *T. canis*, y se dan situaciones socioeconómicas desfavorables, los porcentajes de seropositividad se incrementan (Fillaux *et al.*, 2007). En Venezuela, Lynch *et al.* (1988) comprobaron que el 1'8% de personas residentes en ciudades, y con alto nivel socio-económico, tenían anticuerpos séricos contra *T. canis*, y que eran mucho más altos entre habitantes de chabolas de los suburbios (20%), y sobre todo frente a los de medio rural (25'6%) y los de poblaciones indígenas (34'9%).

Ajayi *et al.* (2000) determinaron que aproximadamente el 30% de la población de Jos State (Nigeria) era positiva a toxocariosis, y que no existía relación directa entre la posesión de perros y la seropositividad. En Bolivia, Cancrini *et al.* (1998) obtuvieron una seropositividad del 34% y en Irán, Sadjjadi *et al.* (2000) indicaron que el 25'6% de la población presentaba anticuerpos séricos frente a *T. canis*, no apreciando diferencias entre distintos grupos de edad, sexo, ni tampoco al tener en cuenta la clase socio-económica. Estos resultados coinciden con los de Genchi *et al.* (1990) y Giacometti *et al.* (2000) en el norte de Italia.

No se ha demostrado que el **sexo** de los pacientes constituya un factor importante en la frecuencia de presentación de la toxocariosis humana. En un estudio desarrollado en Venezuela, García-Pedrique *et al.* (2004) obtuvieron seroprevalencias para toxocariosis del 9'7%, no observando diferencias con respecto al sexo de las personas; estos resultados corroboran los obtenidos previamente por Baboolal y Rawlins (2002) en Isla Trinidad.

En Brasil, Moreira-Silva *et al.* (1998) señalaron el 39% de las muestras como positivas a toxocariosis mediante ELISA, y a pesar de no encontrar diferencias respecto al sexo ni al hábitat, el porcentaje de seropositivos de niños de la periferia fue superior.

Sviben *et al.* (2009) desarrollaron un estudio entre niños asintomáticos de Croacia que presentaban eosinofilia, y comprobaron que el 31% tenían valores de anticuerpos considerados positivos, no apreciándose relación con el sexo de los pacientes.

En habitantes de Egipto, El Shazly *et al.* (2009) analizaron la seroprevalencia de toxocariosis humana (*larva migrans visceral*) y observaron que el 7'7% eran positivos, no encontraron diferencias en relación con el sexo, edad, nivel educacional o con sus ingresos económicos. Estos resultados coinciden en parte con los de Liao *et al.* (2010), quienes afirmaron que el 44'6% de los niños de Suazilandia (Sudáfrica) eran seropositivos, y que no había diferencias según el sexo.

En niños mexicanos de 4-12 años, Muñoz-Gómez *et al.* (2010) obtuvieron una seroprevalencia de anticuerpos frente a *T. canis* de 30'8% en los que tenían asma, por un 19'7% en los que no la tenían. Estos autores llegaron a la conclusión de que esta diferencia se debía a la mayor frecuencia de respuesta cruzada entre los pacientes asmáticos.

2.4.2. Ascariosis

La ascariosis ocasionada por *A. lumbricoides* está directamente relacionada con la **higiene personal, condiciones sanitarias deficientes o lugares en los que se utilizan heces humanas como fertilizante**. La infección se transmite al ingerir alimentos o bebidas contaminadas con huevos del nematodo. Ciertas condiciones como la malnutrición pueden estimular la migración de las larvas, provocando la aparición de la enfermedad clínica (Hagel *et al.*, 1993).

La incidencia de la infección por *A. lumbricoides* es muy baja en los países desarrollados. En España, existen pocas citas que hagan referencia a infecciones en el hombre por helmintos y los pocos estudios que se han realizado confirman su baja prevalencia (Jarabo *et al.* 1995; de la Cruz *et al.*, 1996; Pérez *et al.* 1997).

Llorente *et al.* (2002) realizaron un estudio coprológico de 75 muestras recibidas en el Servicio de Parasitología del Hospital de Zaragoza, y no detectaron ningún caso de ascariosis. Es importante destacar que las infecciones parasitarias diagnosticadas en España corresponden a personas que no adquirieron la infección en nuestro entorno, como apuntan Martín Sánchez *et al.* (2004), quienes señalaron que el 37'5% de los inmigrantes subsaharianos eliminaba huevos de *A. lumbricoides*.

La ascariosis es endémica y constituye un grave problema de salud pública **en zonas donde existe pobreza**, ya que la gente con menos ingresos económicos suele tener un menor nivel de higiene personal, lo que está directamente relacionado con la transmisión del parásito (Torres *et al.*, 1995).

Si bien la infección se presenta en todas las edades, los niños parecen estar infectados con más frecuencia que los adultos. **El grupo de edad con mayor riesgo es el de 3 a 8 años**, que adquieren la parasitación al meter las manos en la boca después de jugar en el suelo contaminado (Flores *et al.*, 2001).

Se desconoce en qué medida participa *A. suum* en la infección humana (Owen, 2005). Hay que destacar que no resulta necesario el contacto directo entre humanos y cerdos para transmitir la enfermedad, ya que los huevos de *A. suum* resisten la desecación y un amplio rango de variaciones de temperatura, por lo que permanecen viables en el ambiente durante mucho tiempo (Bergstrom y Langeland, 1981).



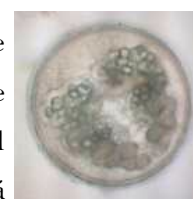
Las personas se pueden infectar con huevos embrionados de *A. suum* al ingerir vegetales frescos cultivados empleando estiércol de cerdo, o por el consumo de hígado crudo de pollos o terneros, que son hospedadores paraténicos de este parásito (Vázquez-Tsuji *et al.*, 1997; Permin *et al.*, 2000; Taira *et al.*, 2004).

En los países nórdicos la prevalencia media de infección por *A. suum* es de 21'5% en las granjas de cerdos, y varía con el manejo, la higiene, edad de los cerdos y región geográfica, aunque muy pocas granjas de cerdos están libres de la infección (Roepstorff *et al.*, 1999). En Dinamarca la infección causada por ascáridos es relativamente rara (2 casos/10.000 habitantes al año), sin embargo, es más frecuente en niños que viven o visitan zonas rurales (36 casos/10.000 habitantes al año). Además, en los últimos años, se han comprobado varios casos de ascariosis en niños daneses que habían estado en contacto con cerdos o con su estiércol (Astrup y Prag, 2001). En estos niños se recogieron formas adultas de *Ascaris* sp.

Pinelli *et al.* (2008) desarrollaron un estudio entre niños de Holanda de 4 años de edad, y comprobaron que el 7% tenía anticuerpos frente a *A. suum*. También demostraron una asociación positiva entre la seroprevalencia de anticuerpos, disnea, asma y sensibilización frente a alérgenos del aire, concluyendo que la infección breve o leve estimula la respuesta alérgica.

2.4.3. Fasciolosis

Existen 2 elementos imprescindibles para la formación de la fase infectiva de *F. hepatica* (metacercaria), la presencia de animales (rumiantes) infectados que eliminan huevos del trematodo a través de la heces, y el medio acuático, en el que encuentra el caracol que actúa como hospedador intermediario, que será infectado por los miracidios que eclosionan de los huevos, y que en el ambiente externo posteriormente emitirá cercarias que se transformarán en metacercarias al perder la cola.





Tradicionalmente se ha considerado que las metacercarias se enquistan sobre diferentes especies vegetales. De este modo, se ha asociado la fasciolosis humana con el consumo de algunos vegetales que se mantienen en ambientes acuáticos como por ejemplo los berros (*Nasturtium officinale*) o canónigos (*Valerianella olitoria*). Sin embargo, también se ha demostrado que la infección se puede producir por el hábito de introducir algunas plantas no acuáticas en la boca, como por ejemplo el *diente de león* (*Taraxacum dens leonis*) o la menta (*Mentha viridis*) (Rondelaud *et al.*, 2000).

Otra posibilidad de infección por *F. hepatica* se produce por la ingestión de agua con metacercarias (Mas-Coma *et al.*, 1999; Rondelaud *et al.*, 2000). En el Altiplano Peruano, Marcos *et al.* (2005) comprobaron que el riesgo de fasciolosis estaba íntimamente ligado a la ingestión de jugo de alfalfa, al consumo de ciertas plantas acuáticas y a la posesión de 5 ovejas o más. En ocasiones, el contacto con las fases infectivas se produce cuando las personas se encuentran desarrollando su trabajo, por ejemplo al recoger juncos con metacercarias, que se llevan a la boca de forma inconsciente.

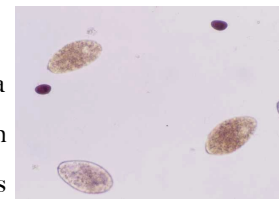


No son numerosos los estudios acerca de la importancia del **hábitat** de los pacientes sobre la infección por *F. hepatica*. Rondelaud *et al.* (2000) expusieron que el motivo del incremento de fasciolosis entre la población urbana francesa observado en los últimos años, podría deberse a la migración de los jóvenes del campo a las ciudades que adquieren la infección durante sus visitas a sus lugares de origen.

Noyer *et al.* (2002) afirmaron que el desarrollo de fasciolosis humana se produce de forma paralela a la infección de ganado bovino.

Como ya se ha citado anteriormente, los métodos coprológicos no siempre resultan satisfactorios para el diagnóstico de fasciolosis, puesto que normalmente la eliminación de huevos del trematodo es escasa y difícil de detectar; otro de los inconvenientes de esta técnica reside en la existencia de casos de fasciolosis ectópica extrabiliar, en la que no se produce eliminación de huevos a través de las heces (Prociv *et al.*, 1992).

Hasta hace algunos años la prevalencia de fasciolosis se determinaba sólo por coprología. En Egipto, Hassan *et al.* (1995) obtuvieron un porcentaje de eliminación de huevos de *F. hepatica* del 5%. En algunas regiones del altiplano boliviano se ha demostrado que sorprendentemente la prevalencia alcanzaba el 68% (Esteban *et al.*, 1999).



Trueba *et al.* (2000) comprobaron por coprología que el 1'3% de la población andina tenía fasciolosis. En un estudio posterior desarrollado en el altiplano peruano se observó que el 33% de la población de una muestra de 93 pacientes eliminaban huevos del trematodo (Marcos *et al.*, 2005), porcentaje que se redujo al 8'6% en un estudio ulterior (Marcos *et al.*, 2008).

En la actualidad se aconseja el empleo de técnicas inmunoenzimáticas de tipo ELISA, que posibilitan la detección precoz de esta zoonosis parasitaria. Apt *et al.* (1992) analizaron los sueros de 5861 habitantes de áreas rurales de Chile, y el 2'73% resultaron positivos a fasciolosis por ELISA. El porcentaje fue superior en mujeres que en hombres.

En Egipto, Hassan *et al.* (1995) en una encuesta epidemiológica realizada en 1350 niños, obtuvieron una seroprevalencia del 17'1%.

Mediante ELISA, O'Neill *et al.* (1999), encontraron que el 59% de la población del altiplano boliviano tenía anticuerpos frente a *Fasciola*.

En una población de 462 personas de Egipto, Safar *et al.* (2005) apreciaron que el 17% eran positivos por ELISA, y que en éstos la eosinofilia era significativamente superior.

Hammami *et al.* (2007) comprobaron en tres regiones de Túnez que la seroprevalencia de anticuerpos frente a antígenos de *F. hepatica* era del 6'6%.

En una encuesta epidemiológica realizada en diferentes regiones del Perú, Marcos *et al.* (2005) apuntaron que en los habitantes de áreas rurales la prevalencia de fasciolosis era mayor que en los que vivían en ciudades, puesto que las posibilidades de ingerir metacercarias eran superiores en los primeros. Entre las causas de infección en zonas rurales destacaron la presencia de animales (rumiantes) en régimen extensivo, que pueden ser el origen de la contaminación de los pastos y los manantiales de agua con metacercarias (Paz-Silva *et al.*, 2003). Estos resultados fueron corroborados por Parkinson *et al.* (2007) en el altiplano boliviano.

Por el contrario, Esteban *et al.* (2002) concluyeron que las elevadas prevalencias de personas con fasciolosis no se correlacionan necesariamente con el hecho de vivir en áreas donde la fasciolosis es un problema veterinario importante.

En un estudio realizado en Turquía con objeto de comparar las posibles diferencias en la prevalencia de fasciolosis entre personas que vivían en ciudades y las que lo hacían en el campo, Kaya *et al.* (2006) observaron que en el hábitat urbano el porcentaje de individuos

positivos era del 2'4%, frente al 9'3% de los que residían en el rural. En el mismo país, Ozturhan *et al.* (2009) mostraron que la seroprevalencia de fasciolosis era muy baja en la región de Mersin, y que no influía si existían antecedentes de infección por el trematodo en la familia. Estos autores apuntaron hacia la construcción de canales de riego como una de las causas principales que favorecen la aparición de fasciolosis en regiones en las que *a priori* no debería suceder.

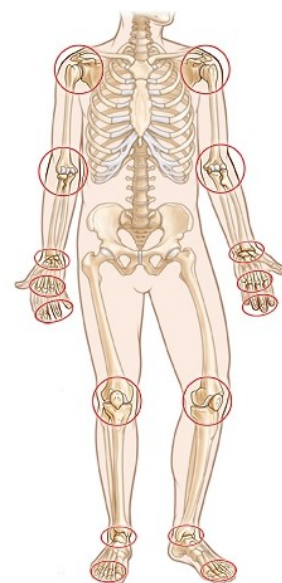
Se ha establecido la influencia del **sexo** de las personas sobre la prevalencia de fasciolosis. Apt *et al.* (1992) y Marcos *et al.* (2005) demostraron que las mujeres presentan mayor predisposición que los hombres a la fasciolosis, lo que sugiere que el factor hormonal podría desempeñar un papel importante en la patogénesis de la infección por *F. hepatica*, o que la modulación de la respuesta inmunitaria difiere con respecto al sexo masculino. Por el contrario, en Francia, Rondelaud *et al.* (2000) comprobaron que no existían diferencias en las prevalencias de fasciolosis entre hombre y mujeres.

Marcos *et al.* (2005), en habitantes del altiplano peruano, observaron que el 52% tenían valores de IgG frente a los antígenos de excreción/secreción del trematodo por lo que se consideraron positivos. Posteriormente, una investigación desarrollada entre niños de las localidades andinas de Huertas-Julcán (Junín), Asillo (Puno) y Cajamarca reveló que el porcentaje de individuos que eliminaban huevos del trematodo en las heces era del 21.1%, 25.4% y 24%, respectivamente. La seroprevalencia de fasciolosis, determinada mediante Fas2-ELISA, fue del 27.8%, 44.6% y 29.1%.

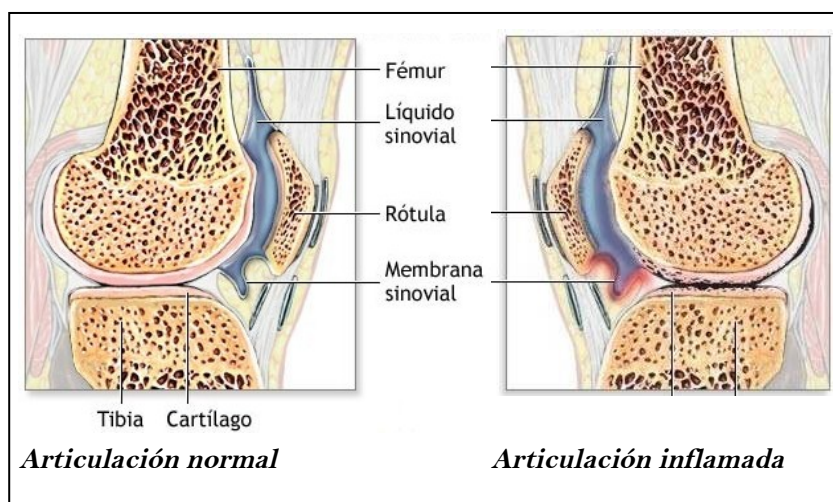
2.5. ARTRITIS REUMATOIDE

El término **Artritis Reumatoide (AR)** deriva de *fiebre reumática*, enfermedad que provoca dolor articular. El sufijo *-oid* significa “que recuerda a”, de modo que artritis reumatoide se podría traducir como *inflamación articular que recuerda a la fiebre reumática*. La primera descripción que se conoce data de 1800, y fue hecha por el Dr. Augustin Jacob Landré-Beauvais (1772–1840) en París.

Se trata de un desorden inflamatorio crónico que puede afectar a diferentes órganos y sistemas, principalmente a la membrana sinovial de las articulaciones diartrodiales, de las vainas tendinosas y de las bursas sinoviales de deslizamiento (Olivares *et al.*, 2010). En la imagen adyacente se indican las localizaciones más frecuentes.



El proceso produce una respuesta inflamatoria de la sinovia (*sinovitis*) secundaria a la hiperplasia de las células sinoviales, exceso de líquido sinovial y el desarrollo de *pannus* en la sinovia. La patología del proceso morboso a menudo conduce a la destrucción del cartílago articular y anquilosis de las articulaciones. En la imagen inferior se refleja este proceso en la articulación fémoro-tibial.



No se conoce con exactitud la prevalencia de AR en España, pero algunos estudios en países de nuestro entorno describen tasas que oscilan entre 1'6 y 5% (Gram *et al.*, 1997). En general se acepta que la prevalencia puede ser similar a la de otros países europeos o a las de la población blanca norteamericana, alrededor del 1%.

Se ha detectado una mayor predisposición en las mujeres (3 veces más) (Edwards y Cooper, 2006), pero cuando el análisis de la incidencia entre sexos se limita a formas seropositivas y erosivas de la enfermedad, no se encuentran diferencias.

La **edad** más frecuente de aparición se sitúa entre la cuarta y la sexta década de vida (Mac Gregor *et al.*, 1994) aunque puede aparecer a cualquier edad (Rindfleisch y Muller, 2005). Los pacientes con AR tienen una expectativa de vida más corta de entre 3 y 10 años. Los estudios de mortalidad han demostrado que las causas de muerte son similares a las de la población general, pero aparecen antes. Los factores relacionados con mayor mortalidad son: edad joven al diagnóstico, sexo masculino, nivel cultural bajo, historia de tabaquismo, título alto de factor reumatoide, nódulos subcutáneos y elevación persistente de parámetros de laboratorio relacionados con actividad de la enfermedad (Miall, 1955).

La AR tiene una gran repercusión socio-económica por afectar a una población que en su mayoría se encuentra en edad laboral, llegando a provocar una condición dolorosa e incapacitadora que puede llevar a la pérdida sustancial de función y movilidad si no se trata de forma adecuada. En algunos estudios llega a representar un 10% de las causas de incapacidad permanente para cualquier tipo de trabajo (Kellgren *et al.*, 1956).

Sullivan *et al.* (2010) emplearon el Medical Expenditure Panel Survey (MEPS) para estimar la influencia de AR en el empleo, limitaciones en el trabajo o en las tareas caseras, incapacidad para trabajar o cumplir con los quehaceres domésticos, días de trabajo perdidos, tiempo pasado enfermo en cama e ingresos anuales. El MEPS es una encuesta representativa de la población americana. Combina el empleo de análisis logístico múltiple, binomial negativo y la selección de regresión de Heckman, controlando la edad, sexo, raza, etnia, hábito de fumar, ingresos, educación y con morbilidad crónica. La identificación de AR se realizó atendiendo la Clasificación Internacional de Enfermedades 9, Código 714.

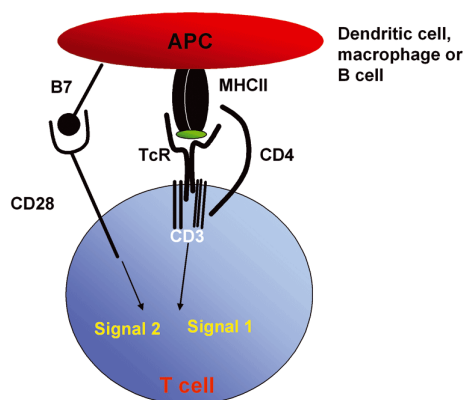
Con este estudio demostraron que los individuos con AR eran mayores de 40 años, tenían más condiciones de cronicidad, perdían más días de trabajo, pasaban más tiempo enfermos en cama, ingresaban menos dinero, alcanzaban elevados grados de limitaciones e incapacidad para trabajar, y recibían beneficios por incapacidad. Después del ajuste de los datos, observaron que los pacientes con AR encontraban menos trabajo en un 53%, tenían 3 veces más limitaciones para trabajar en casa o fuera, 2 veces más incapaces, y pasaban 3 veces más tiempo postrados que los que no presentaban AR. Como conclusión, señalan que los enfermos de AR sufrían reducciones en el empleo, productividad y funcionalidad.

Aunque se considera una enfermedad articular, la artritis reumatoide está asociada al desarrollo de manifestaciones extra-articulares. Sahatçiu-Meka y Anton (2010) demostraron que los pacientes seropositivos a AR presentaban mayor frecuencia de fibrosis pulmonar difusa y alteraciones del sistema nervioso central y periférico. Los nódulos reumatoides fueron más frecuentes en los seropositivos. Concluyen que las manifestaciones extra-articulares son más frecuentes en pacientes seropositivos, y que a mayor duración de la enfermedad se incrementa el número de manifestaciones extra-articulares. También se ha descrito inflamación difusa en el pericardio, pleura y esclera, así como lesiones nodulares frecuentes en tejido subcutáneo. Aunque se desconoce su causa, algunos fenómenos de autoinmunidad juegan un papel clave tanto en la cronicidad como en su progresión, y se considera como una enfermedad sistémica autoinmune.

En la actualidad se dispone de varios tratamientos. Los no farmacológicos se basan en terapia física, ortosis, terapia ocupacional y nutricional, pero no detienen el avance de la destrucción articular. Para suprimir los síntomas se emplean analgésicos y anti-inflamatorios que incluyen esteroides, en tanto que se precisa de productos anti-reumáticos que modifican la enfermedad (*disease-modifying antirheumatic drugs*, DMARDs) para inhibir o reducir el proceso inmunitario y prevenir el daño a largo plazo (LemaGontad *et al.*, 2010). En fechas recientes se han incrementado las opciones de tratamiento con el desarrollo del nuevo grupo de *biológicos* (Majithia y Geraci, 2007). Otro factor implicado en la disminución de la expectativa de vida es el fallecimiento por efectos secundarios de la medicación empleada en el tratamiento.

2.5.1. Etiología de la AR

Actualmente se desconoce el antígeno o antígenos que desencadenan la respuesta inflamatoria crónica en la artritis reumatoide. En general, se acepta que los factores iniciadores, presumiblemente infecciosos, inciden en individuos genéticamente predispuestos. Los factores genéticos actuarían además modulando la expresión de la enfermedad en relación con su severidad o cronicidad (Majithia y Geraci, 2007).

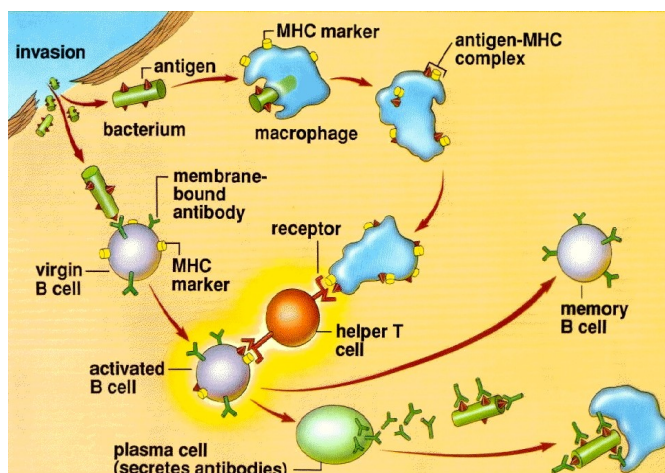


•**Factores genéticos:** se estima que constituyen el 30-35% de la susceptibilidad para padecer AR (Arnett *et al.*, 1988). De todos ellos, los mejor conocidos son los genes relacionados con la presentación antigénica que codifican para antígenos de histocompatibilidad (HLA) de clase II (imagen izquierda) (Pinto *et al.*, 2008). Estos antígenos se expresan en células presentadoras de antígeno

(APC) y células B. Aparecen durante la activación de otros tipos celulares (linfocitos T, células endoteliales, sinoviocitos tipo fibroblasto...). Las moléculas de clase II presentan a los linfocitos T proteínas antigénicas propias o extrañas que han sido endocitadas por pinocitosis y procesadas por células presentadoras de antígeno (Brooks, 2006).

Los genes de las moléculas de histocompatibilidad de clase II se encuentran codificados por el cromosoma 6, en la región D del complejo principal de histocompatibilidad. En esta región se diferencian 3 grupos de genes, DP, DQ y DR. La primera descripción de la asociación entre determinados alelos de los antígenos de clase II y la AR la realizó Stastny en 1978, al demostrar una mayor frecuencia del subtipo Dw4 de HLA-DR4 en pacientes con AR. Posteriormente se comprobó que un 60-70% de los pacientes caucásicos con AR son HLA-DR4 positivos frente a una frecuencia del 25-30% en la población sana. Mediante nuevas técnicas se ha podido determinar que algunos de los subtipos que confieren mayor susceptibilidad para padecer la AR poseen una secuencia común de aminoácidos en la tercera región hipervariable del primer dominio de la cadena DR β 1. Esta secuencia de aminoácidos denominada **epítipo compartido** parece ser crítica para predisponer al padecimiento de la enfermedad (Bovin *et al.*, 2004).

•**Factores iniciadores:** como se refleja esta imagen, sobre la base de factores genéticos predisponentes algunos estímulos son capaces de iniciar una respuesta inmunitaria que en ocasiones se traduce en el desarrollo de mecanismos efectores que finalizarán en la destrucción articular característica de la AR. Los intentos para identificar los factores



ambientales específicos que actúan como agentes etiológicos han sido por el momento fallidos, aunque existe la idea generalizada que un agente infeccioso pueda ser el factor iniciador. Esta sospecha se basa en la presentación de cuadros de poliartritis muy similares a la AR en el curso de algunas infecciones como la enfermedad de Lyme o la rubéola, la infección por parvovirus B19 (Arnett *et al.*, 1988). Por otra parte, se ha demostrado títulos más altos de anticuerpos contra ciertos gérmenes (*Campylobacter*, *Yersinia*, *Salmonella*...) en pacientes con AR que en la población sana. El virus de Epstein-Barr también se ha estudiado por haberse detectado homología entre parte de algunas de sus proteínas y fragmentos de factores reumatoides, también se ha detectado homología entre el epítipo compartido y fragmentos de la proteína gp10 de dicho virus (Van Roon *et al.*, 2006).

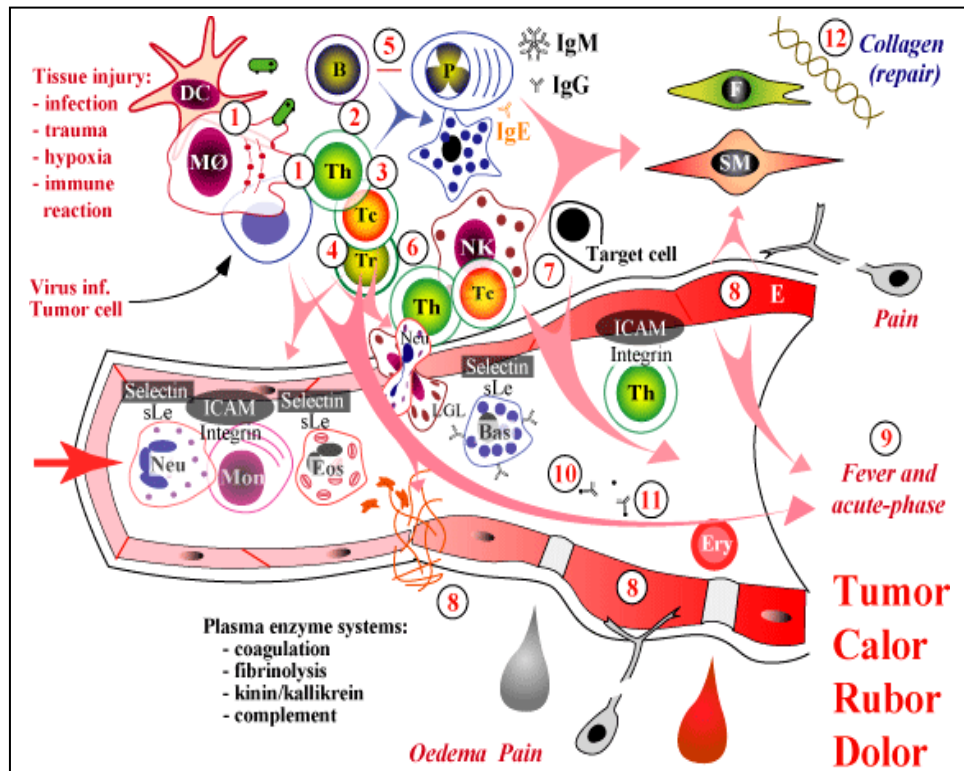
Existen diferentes mecanismos potenciales por los cuales la infección temprana puede alterar el desarrollo del sistema inmunitario (Edwards *et al.*, 2005). Las infecciones parasitarias aumentan la producción de citocinas anti-inflamatorias como la IL-10 (Van den Biggelaar *et al.*, 2000; Mangan *et al.*, 2004). Se ha afirmado que el efecto acumulativo de la exposición a infecciones repetidas o *carga patógena* tiene efectos duraderos o de recuerdo sobre el nivel de respuesta inflamatoria de un individuo.

Zhu *et al.* (2000) demostraron que existía relación entre la carga patógena elevada y los niveles incrementados de proteína C-reactiva; parece que la exposición a diferentes patógenos estimula la producción de niveles elevados de IL-6 y CRP; esta citocinemia inflamatoria puede inducir la aparición de una enfermedad autoinmune. Existen evidencias de que, al igual que los autoanticuerpos, los valores de citocinas se pueden incrementar antes de la aparición de AR. Edwards y Cooper (2006) concluyeron que un sistema inmunitario en desarrollo, expuesto a condiciones idóneas de higiene, produce más FR y quizás empieza antes el proceso patológico que lleva a la AR.

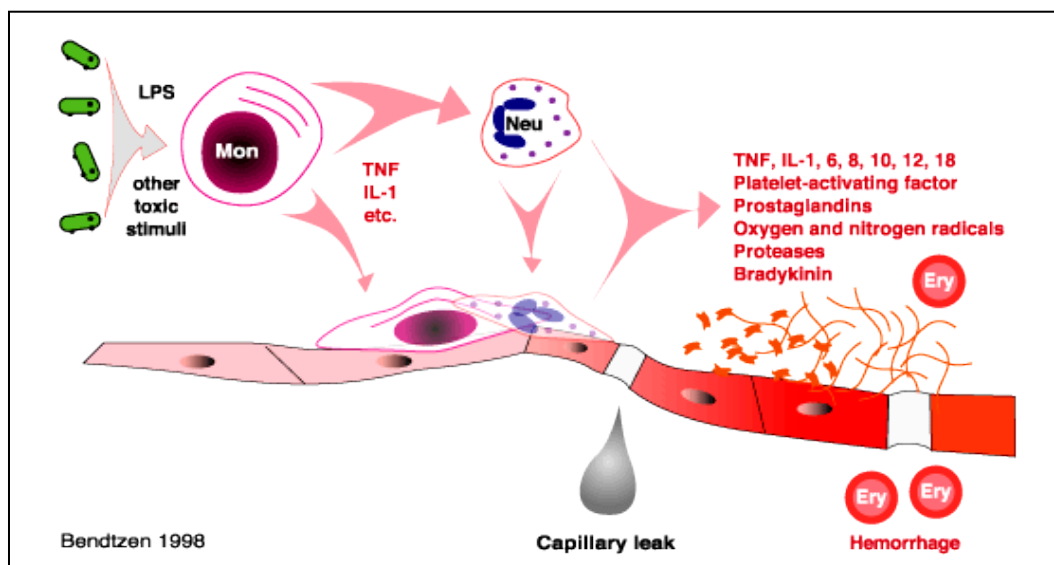
Es posible que se compartan mecanismos comunes entre enfermedades infecciosas y autoinmunes, según los cuales las infecciones en sus periodos críticos producen daños permanentes y cambios en el funcionamiento del sistema inmunitario, que junto con factores genéticos y ambientales, pueden contribuir al desarrollo de esta enfermedad.

2.5.2. Patogenia de la AR

Como se recoge en la siguiente imagen, existen múltiples células (linfocitos, macrófagos, sinoviocitos, neutrófilos, osteoclastos...) y mediadores inflamatorios (moléculas de adhesión, citocinas proinflamatorias e inmunorreguladoras, enzimas proteolíticas...) que se interrelacionan en un complejo entramado que tras iniciar la respuesta inflamatoria anómala, pone en marcha y perpetúa los mecanismos efectores de la destrucción articular (Panayi *et al.*, 2001).

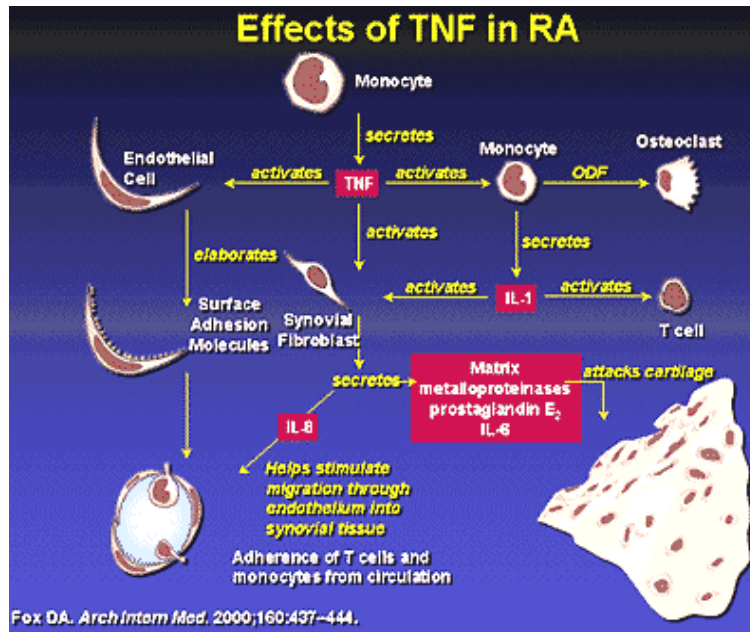


Se desconoce la naturaleza del agente inicial que provoca la puesta en marcha de la respuesta inflamatoria. Las primeras manifestaciones aparecen en la microvasculatura de la capa de revestimiento de la sinovial. Las células endoteliales de estos microvasos sufren cambios en su configuración y expresan en su superficie moléculas de adhesión que favorecen la migración e infiltración por células mononucleares (principalmente linfocitos T memoria) (Van Boekel *et al.*, 2002). La activación de estas células T provoca la liberación de citocinas (IL-2, IL-17, IFN- γ) que a su vez actúan sobre otros tipos celulares, fundamentalmente macrófagos y linfocitos B, provocando su activación (Vervoordeldonk y Tak, 2002; Goldring, 2002).



La estimulación de las células B y su consiguiente diferenciación a células plasmáticas activa la producción de inmunoglobulinas policlonales y Factor Reumatoide. Este último tiene un papel perpetuador de la respuesta inflamatoria actuando a través de dos mecanismos:

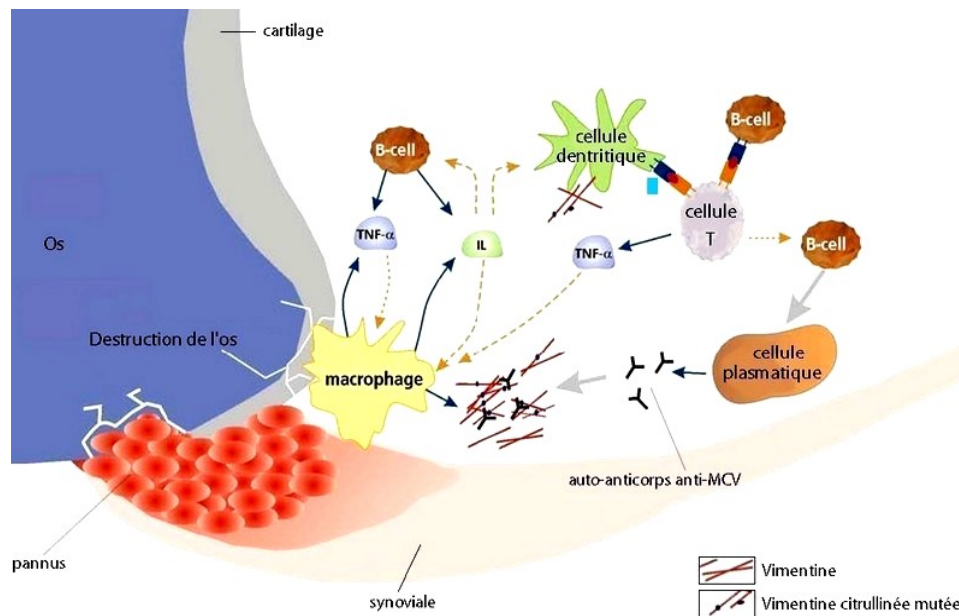
- 1) Activación del sistema de complemento
- 2) Presentación de antígenos a los linfocitos T por parte de los linfocitos B con Ig en su superficie.



Los macrófagos activados son los principales productores de TNF- α que a su vez estimula la producción de otras citoquinas proinflamatorias, como la IL-1, IL-6, IL-8 y otras citocinas implicadas en la aterogénesis y proliferación de fibroblastos (PDGF, FGF, TGF- β ...) (Hanaoka *et al.*, 2003). Se produce entonces un desequilibrio entre los mediadores pro y anti-

inflamatorios, a favor de los primeros, que desencadena la cascada inflamatoria (Chung *et al.*, 2006). En la figura adjunta se resume la participación del TNF en la génesis de la AR (Fox, 2000).

La persistencia de células activadas provoca las alteraciones estructurales típicas de la AR. Los neutrófilos, sinoviocitos y macrófagos son los tres tipos de células fundamentales que participan en el daño articular mediante la producción y liberación de metaloproteasas y otras enzimas proteolíticas (Van Roon *et al.*, 2006). La proliferación de sinoviocitos activados lleva a la hiperplasia sinovial y a la formación de *pannus*, un tejido con un comportamiento pseudotumoral que contribuye a la destrucción del cartílago, el hueso subcondral y los ligamentos (imagen inferior) (Bugatti *et al.*, 2007).



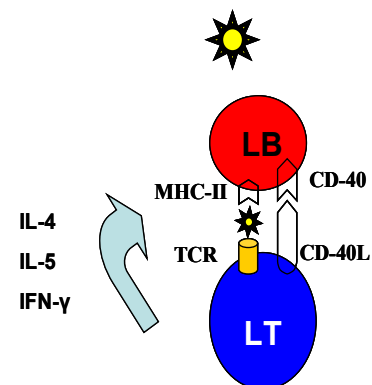
Se ha descrito que acompañando a las alteraciones mencionadas anteriormente, se producen modificaciones en los residuos arginina de proteínas como la queratina, filaggrina, fibrinógeno o vimentina, que se convierten en residuos citrulinados, que el sistema inmunitario reconoce como *extraños* e induce la síntesis de autoanticuerpos denominados *anti-citrullinated protein antibodies* (ACPAs), y que se emplean como potentes biomarcadores que permiten el diagnóstico de AR en estadios precoces (Avouac *et al.*, 2006; Raptopoulou *et al.*, 2007). Recientemente han sido incluidos entre los nuevos criterios establecidos por el *American College of Rheumatology* (ACR) y la *European League Against Rheumatism* (EULAR) para revisar el diagnóstico de la AR (Aletaha *et al.*, 2010).

2.5.3. Autoanticuerpos en la AR

La respuesta inmunitaria que tiene lugar durante el desarrollo de diferentes padecimientos reumáticos y por ello en la artritis reumatoide, incluye la producción de una serie de autoanticuerpos que van a desempeñar una función importante en algunos mecanismos asociados a la patología de estos procesos.

Factor Reumatoide (FR)

Resulta más correcto el término en plural (*factores reumatoides*), puesto que se trata de autoanticuerpos dirigidos contra epítomos localizados en el fragmento Fc de la IgG, entre los dominios CH₂-CH₃ de la cadena pesada γ.



Aunque predominan los anticuerpos de clase IgM, también se han descrito los isotipos IgG, IgA e IgE (Varbanova *et al.*, 1999).

La primera descripción de presencia de Factor Reumatoide en el suero fue realizada por Cecil, Nicolls y Stainsby en 1930, en el transcurso de un estudio que demostró en enfermos con sintomatología clínica de Artritis Reumatoide (en este tiempo llamada artritis infecciosa crónica) presentaban un título alto de aglutininas antiestreptocócicas, a pesar de no encontrar el microorganismo ni en la articulación ni en la sangre. Diez años más tarde, Waaler describió que en una tercera parte del suero de los pacientes con Artritis Reumatoide (AR) y en una pequeña proporción de personas sanas, se producía la aglutinación de los hematíes de carnero en presencia de anticuerpos de conejo dirigidos contra los hematíes de carnero, siempre que esta sensibilización fuese previa a añadir el suero de los enfermos con AR. Posteriormente, en el año 1948, Rose reprodujo este hallazgo y se comenzó a asociar el FR con la AR, aunque también se confirmó que en una persona sana puede detectarse FR, y que no todos los pacientes con AR lo presentan (Figueroa, 2003).

En 1958, Kunkel y Franklin demostraron que la actividad sérica denominada factor reumatoide era un anticuerpo IgM dirigido contra anticuerpos IgG. Previamente, se había considerado la presencia de factor reumatoide como un criterio para el diagnóstico de la AR (Ropes *et al.*, 1956) y en la actualidad continúa formando parte de los criterios diagnósticos actuales propuesto por el *American College of Rheumatology* para el diagnóstico de la AR, como ya se ha mencionado con anterioridad.

Mecanismos de producción y función del FR

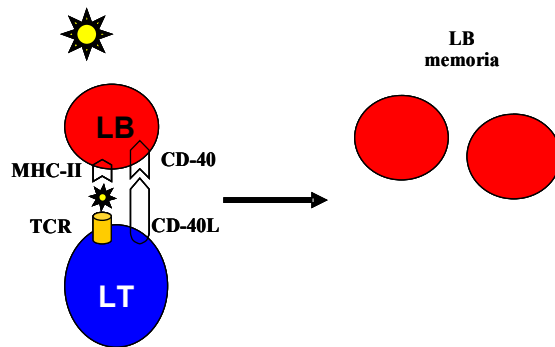
Se han descrito varios tipos diferentes de FR: producido por células B de personas sanas, en enfermedades linfoproliferativas, en enfermedades inflamatorias crónicas distintas de la AR, y en la membrana sinovial de pacientes con AR.

En individuos sanos se sintetizan FR que son IgM policlonales de baja afinidad y polirreactividad con múltiples antígenos. A pesar de la ausencia de FR circulante, los tejidos linfoides de personas sanas contienen abundantes linfocitos B que expresan FR en la membrana plasmática, y en sangre periférica existen células B portadoras de FR que en respuesta a diferentes estímulos liberan FR (Mewar y Wilson, 2006).

Durante el curso de respuestas inflamatorias agudas y crónicas, la producción de FR continúa hasta que desaparece el estímulo desencadenante. El FR parece que puede contribuir también a la formación de grandes inmunocomplejos que pueden ser fácilmente eliminados de la sangre. Se cree que podría estar relacionado con el desarrollo de la respuesta específica a

infecciones facilitando la función de las células B como células presentadoras de antígenos a los linfocitos CD4 (Nielen *et al.*, 2004).

Las células B que expresan en su membrana inmunoglobulinas con actividad FR pueden



capturar inmunocomplejos IgG unidos a sus antígenos específicos. Una vez que los complejos inmunes se han unido a los receptores de membrana de las células B con especificidad FR, los interiorizan y procesan los antígenos, que posteriormente serán presentados a las células T como epítomos en el contexto de las moléculas de

histocompatibilidad de clase II.

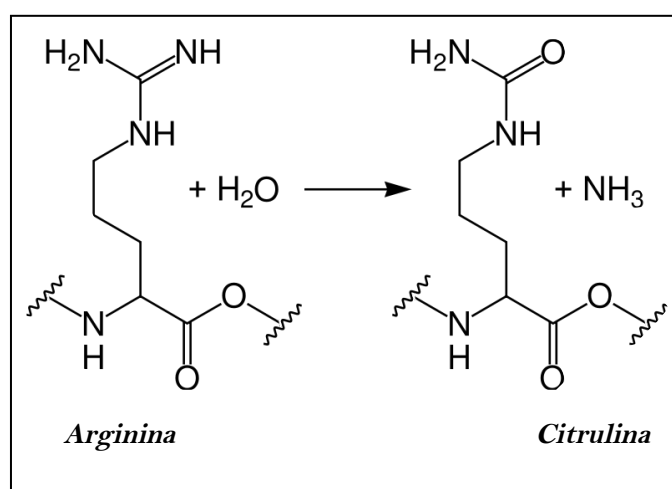
A diferencia del FR fisiológico, el FR sintetizado en la membrana sinovial de AR puede ser de cualquier clase, predominantemente IgM, IgG e IgA, que presentan alta afinidad y especificidad antigénica restringida al fragmento Fc. En la AR, el FR juega un papel central en la patogenia de la enfermedad al generar inmunocomplejos circulantes predominantemente extravasculares con localización preferente en la membrana sinovial (Symmons, 2007). El FR producido en enfermedades linfoproliferativas es monoclonal y se produce como consecuencia de la proliferación del clon tumoral.

Anticuerpos frente a proteínas citrulinadas (ACPAs)

En años recientes, el estudio de la reactividad de los autoanticuerpos antiproteínas citrulinadas ha adquirido gran interés. Los anticuerpos que más se han asociado con la AR son: los anticuerpos antifactorperinuclear (AFP) y antiqueratina (AKA), ambos dirigidos contra filagrina citrulinada (Sebbag *et al.*, 1995); anticuerpos anti-Sa, los cuales reconocen vimentina citrulinada (Vossenaar *et al.*, 2004) y anticuerpos contra péptidos cíclicos citrulinados (anti-PCC). Estos últimos tienen una sensibilidad mayor del 80% y especificidad del 98% en pacientes con AR (Schellekens *et al.*, 2000). Además de su alta sensibilidad y especificidad, se presentan en etapas tempranas de la enfermedad.

El estudio de la citrulinación de proteínas ha adquirido gran interés debido a su participación en diversos procesos, tanto fisiológicos como patológicos. Dentro de los procesos fisiológicos, se incluye la diferenciación terminal de células epiteliales, la regulación en la expresión de genes y la apoptosis; en tanto que en los procesos patológicos, las proteínas citrulinadas se han relacionado con la progresión de la enfermedad en AR, esclerosis múltiple y Alzheimer, entre otros (Olivares *et al.*, 2010).

La conversión de arginina en citrulina es capaz de activar la respuesta inmunitaria, debido a un cambio en la carga del aminoácido. En autoinmunidad, la expresión de PAD4 se ha asociado con el desarrollo de manifestaciones clínicas de AR (Majka *et al.*, 2008). Recientemente, se ha demostrado que la presencia de anticuerpos contra proteínas citrulinadas, así como la expresión de PAD4, preceden a la aparición de manifestaciones clínicas en AR (Nielen *et al.*, 2004). Por otro lado, también se han detectado PAD2 y proteínas citrulinadas en el líquido sinovial de pacientes con AR y espondiloartritis (EA), lo que sugiere que la citrulinación es un proceso asociado a la inflamación, pero la generación de anticuerpos patogénicos que reconocen proteínas citrulinadas es un proceso específico de la AR (Kinloch *et al.*, 2008).



Los autoanticuerpos contra la vimentina citrulinada mutada son marcadores altamente específicos y extremadamente sensibles frente a la artritis reumatoide (especificidad 97%, sensibilidad mayor al 82%). Los autoanticuerpos MCV son un indicador avanzado de lesiones en las articulaciones y de progresión agresiva de la enfermedad. En contraste a la detección de anticuerpos contra péptidos citrulinados cíclicos sintéticos, cambios en la concentración de anti-MCV corresponden a alteraciones de los parámetros clínicos.

2.6. DIAGNÓSTICO DE ARTRITIS REUMATOIDE

2.6.1. Examen clínico

Existe un diagnóstico clínico en base a los síntomas, examen físico, radiografías y laboratorio. El *American College of Rheumatology* (ACR) y la *European League Against Rheumatism* (EULAR) editaron unas líneas maestras para el diagnóstico de AR, indicando que ha de ser realizada por un reumatólogo o un experto en enfermedades autoinmunes (Majithia y Geraci, 2007). Los criterios del **ACR** son los siguientes (Arnett *et al.*, 1988):

1. Rigidez matinal: sensación percibida en las articulaciones afectadas y que dura por lo menos 1 hora antes de desaparecer
2. Artritis en tres o más articulaciones
3. Artritis de las articulaciones de la mano: por lo menos una región articular inflamada (muñeca, interfalángica proximal (IFP), metacarpofalángica (MCF), o ambas))
4. Artritis simétrica: compromiso simultáneo de la articulación par, aunque en el caso de las articulaciones IFP, MCF y metatarsofalángica (MTF), este criterio es aceptable aun cuando la simetría no sea absoluta
5. Nódulos reumatoideos: nódulos subcutáneos observados por el médico sobre las prominencias óseas o en superficies de extensión o regiones yuxtaarticulares
6. Factor reumatoide positivo en suero: dentro de valores considerados propios de esta enfermedad
7. Alteraciones radiológicas características: cambios radiográficos típicos de artritis reumatoide en las placas de mano y muñeca en la toma pósterio-anterior, debiendo incluir erosiones o descalcificación ósea localizada, sin lugar a dudas

El diagnóstico de AR se establece cuando se cumplen 4 de los 7 criterios mencionados, y los puntos 1 a 4 deben estar presentes por lo menos durante 6 semanas.

El 4'6% de una muestra de población de Rusia con inflamación articular resultó positiva a AR siguiendo los criterios del ACR (1987), en tanto que fue del 0'6% entre la población total. Llegaron a la conclusión de que existe un hiperdiagnóstico de esta enfermedad dado que suele basarse en la presentación de inflamación en las articulaciones (Galushko *et al.*, 2010).

En una encuesta realizada en la región central de Grecia, Anagnostopoulos *et al.* (2010) enviaron por correo una encuesta a más de 3000 personas preguntándoles por la presencia de cualquier enfermedad reumática. Todos los casos positivos se confirmaron posteriormente mediante examen clínico con los criterios del ACR. El 24'6% de los encuestados respondieron que tenían una enfermedad reumática. La prevalencia de AR fue del 0'58%, artritis psoriática

0'35%, espondilitis anquilosante 0'29%, síndrome primario de Sjögren 0'23%, y 0'11% lupus sistémico eritematoso. De estos resultados concluyeron que las enfermedades reumáticas afectan casi a la cuarta parte de la población adulta, y que la osteoartritis y la gota son los desórdenes articulares más frecuentes.

En Argentina, entre personas sobre las que había sospecha de AR, se demostró que prácticamente el 1% cumplían los criterios del ACR, observándose una mayor prevalencia en mujeres (1'5%) que en hombres (0'4%) (Scublinsky *et al.*, 2010).

En julio de 2010 se ha llevado a cabo una revisión de los criterios de clasificación de la artritis por el *American College of Rheumatology* (ACR) y la *European League Against Rheumatism* (EULAR), con objeto de incrementar la sensibilidad de la detección de la artritis reumatoide precoz (Aletaha *et al.*, 2010). Bajo estos nuevos criterios, se considera AR establecida cuando se confirma la presencia de sinovitis en al menos una articulación, ausencia de un diagnóstico que explique mejor la sinovitis, y alcanzar una puntuación mayor o igual a 6 (de un posible de 10) para las puntuaciones individuales en 4 aspectos: número y localización de las articulaciones afectadas (rango puntuación 0-5), anormalidad serológica (0-3) respuesta elevada en la fase aguda (0-1) y duración de los síntomas (2 niveles; rango 0-1).

Criterios de clasificación para la AR (algoritmo basado en puntuación: sumar la puntuación de las categorías A-D; es necesaria una puntuación de $\geq 6/10$ para la clasificación de un paciente con AR definitiva)[‡]	Puntuación
A. Compromiso articular[§] 1 articulación grande 2-10 articulaciones grandes 1-3 articulaciones pequeñas (con o sin compromiso de articulaciones grandes)[#] 4-10 articulaciones pequeñas (con o sin compromiso de grandes articulaciones) > 10 articulaciones pequeñas^{**}	0 1 2 3 5
B. Serología (al menos 1 resultado de la prueba es necesaria para la clasificación)^{††} FR negativo y ACPA negativo FR débil positivo o ACPA débil positivo FR fuerte positivo o ACPA fuerte positivo	0 2 3
C. Reactantes de fase aguda (al menos 1 prueba es necesaria para la clasificación)^{‡‡} PCR Normal y VSG normal PCR anormal o VSG anormal	0 1
D. Duración de los síntomas^{§§} <6 semanas ≥ 6 semanas	0 1

Leyenda:

Los criterios tienen por objeto la clasificación de nuevos pacientes. Además, los pacientes con enfermedad erosiva típica de artritis reumatoide (AR) con una historia compatible con cumplimiento previo de los criterios de 2010 se deben clasificar como AR. Los pacientes con enfermedad de larga duración, incluidos aquellos cuya enfermedad está inactiva (con o sin tratamiento) que, basados en datos disponibles en forma retrospectiva, y que cumplan los criterios 2010 deben ser clasificados como AR.

Los diagnósticos diferenciales varían entre los pacientes con diferentes presentaciones, pero pueden incluir condiciones tales como lupus eritematoso sistémico, artritis psoriásica, y gota. Si no está claro sobre el diagnóstico diferencial relevante a considerar, un reumatólogo experto debe ser consultado.

[‡]Aunque los pacientes con una puntuación de $<6/10$ no pueden clasificarse como AR, su condición puede ser reevaluada y los criterios pueden cumplirse acumulativamente con el tiempo.

[§]La afectación articular se refiere a cualquier articulación tumefacta o dolorosa en el examen, que puede ser confirmada por evidencia en imágenes de sinovitis. Las articulaciones interfalángicas distales, las primeras articulaciones carpometacarpianas y las primeras articulaciones metatarsofalángicas están excluidas de la evaluación. Las categorías de distribución articular se clasifican de acuerdo a la ubicación y el número de articulaciones afectadas, con la colocación en la categoría más alta posible, basándose en el patrón de afectación articular.

"Articulaciones grandes" se refiere a hombros, codos, caderas, rodillas y tobillos.

[#]"Articulaciones pequeñas" alude a articulaciones metacarpofalángicas, articulaciones interfalángicas proximales, de la segunda a quinta articulaciones metatarsofalángicas, articulaciones interfalángicas del pulgar, y las muñecas.

^{**} En esta categoría, por lo menos una de las articulaciones implicadas deben ser una pequeña articulación; las otras articulaciones pueden incluir cualquier combinación de grandes y pequeñas articulaciones adicionales, así como otras articulaciones que no figuren específicamente en el listado previo (por ejemplo, temporomandibular, acromioclavicular, esternoclavicular, etc.).

^{††}Negativo se refiere a los valores de IU que son menores o igual al límite superior normal (LSN) en la prueba de laboratorio; positivas débiles se refiere a los valores de IU que son más altos que el límite normal superior, pero ≤ 3 veces el LSN de la prueba del laboratorio; positiva fuerte se refiere a los valores de IU que son más de 3 veces el límite normal superior para la prueba del laboratorio. Cuando la información del factor reumatoide (FR) sólo está disponible como positivo o negativo, un resultado positivo debe ser clasificado como débil positivo de FR. ACPA = anticuerpos anti-proteína citrulinados.

^{‡‡}Normal/anormal está determinado por las normas de laboratorio local. PCR = proteína C-reactiva; VSG = velocidad de sedimentación globular.

§§Duración de los síntomas del paciente se refiere al auto-informe de la duración de los signos o síntomas de sinovitis (por ejemplo, dolor, hinchazón, sensibilidad al tacto) de las articulaciones que están afectados clínicamente en el momento de la evaluación, independientemente del estado de tratamiento.

2.6.2. Laboratorial

Ante la sospecha clínica de AR, se precisan pruebas laboratoriales que contribuyan a esclarecer el diagnóstico. Existen diferentes técnicas inmunológicas que resultan útiles, como la detección de autoanticuerpos como los factores reumatoides (FR), o de anticuerpos frente a péptidos con citrulina (ACPAs).

Factor Reumatoide (FR)

La presencia de FR no está unida directamente con el diagnóstico de AR, y un paciente FR negativo no descarta la enfermedad reumática. En ocasiones se clasifica la AR como **seronegativa**, puesto que se ha demostrado que así sucede en el 15% de los casos (Nishimura *et al.*, 2007). Durante los primeros años de enfermedad, el FR tiende a ser negativo, y se produce la seroconversión con el paso de tiempo. También es importante destacar que los FR se presentan en otras enfermedades, como el síndrome de Sjögren, hepatitis C, infecciones crónicas y aproximadamente el 10% de la población sana, por lo que esta prueba no es muy específica (Díez-Morrondo *et al.*, 2010).

Se ha determinado la presencia de FR en el suero de una proporción variable de pacientes con otras enfermedades reumáticas, enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, enfermedades infecciosas, enfermedades linfoproliferativas y en algunos individuos aparentemente sanos, en particular después de estímulos antigénicos. La incidencia exacta depende de la técnica de laboratorio empleada para su determinación:

Enfermedades autoinmunes: AR, Lupus eritematoso sistémico, Esclerodermia, Síndrome de Sjögren.

Infecciones virales: SIDA, Hepatitis, Mononucleosis.

Infecciones bacterianas crónicas: Tuberculosis, Lepra, Sífilis, Brucelosis, Salmonelosis, Endocarditis bacteriana subaguda.

Infecciones parasitarias: Tripanosomosis, Esquistosomosis, Ascariosis, Toxocariosis, Estrongilosis.

Enfermedades linfoproliferativas: Leucemia linfoide crónica, Macroglobulinemia de Waldstrom, Crioglobulinemia.

Neoplasias: después de radioterapia o quimioterapia.

Se han establecido algunos factores de riesgo implicados en el desarrollo de FR. Moal *et al.* (1990) no encontraron diferencias en la presentación de FR en función del **sexo** de los

pacientes, lo que coincide con los resultados de Hanvivatvong *et al.* (2003), quienes manifestaron que no existían diferencias en la presencia de FR con respecto al sexo.

Edwards *et al.* (2005) comprobaron que existía relación entre la higiene infantil y los valores de FR cuando las niñas se hacían mujeres; de igual modo, demostraron que el descanso en habitaciones compartidas reducía el riesgo de FR, en tanto que las personas de mayor estatus social con medidas de higiene adecuadas, tenían mayor riesgo de desarrollar niveles altos de FR.

Entre los factores que favorecen la aparición de FR destaca fumar, Young *et al.* (2007) afirmaron que los niños que vivían en un ambiente con personas fumadoras presentaban un mayor riesgo de positividad a la presencia de FR. Un nivel bajo de educación, la exposición a animales de granja y a insectos vectores de enfermedades, así como el consumo de alcohol y de café estimula el desarrollo de FR (Reckner *et al.*, 2001). Asimismo, se ha demostrado que el uso de contraceptivos orales reduce la probabilidad de valores altos de FR (Bhatia *et al.*, 2006).

El ejercicio de algunas ocupaciones o profesiones conlleva un mayor riesgo de producción de niveles elevados de FR. Reckner *et al.* (2001) observaron relación entre las ocupaciones de granjeros, jardineros y limpiadores, y el desarrollo de AR y FR, y concluyeron que podía deberse a la inhalación de antígenos que actúan como adyuvantes inmunitarios, facilitando la aparición de una respuesta inflamatoria frente a diferentes factores etiológicos.

Las pruebas más empleadas actualmente se resumen en el siguiente cuadro (Sánchez-Andrade, 2008):

Técnica	Coste	Sensibilidad	Cuantificable	Isotipo
Waalser-Rose	+++	++	+	IgM
Látex	+	+	+	IgM
Nefelometría	++	+	+++	IgM IgG
ELISA	+	+++	++	IgM IgA IgG IgE
RIA	++	+++	++	IgM IgA IgG IgE

Anticuerpos frente a proteínas citrulinadas (FR)

En los últimos años se han desarrollado nuevas pruebas orientadas a la detección de anticuerpos frente a proteínas citrulinadas (ACPAs, *anti-citrullinated protein antibodies*). Al igual que para los FR, estos procedimientos sólo son positivos en una proporción (67-80%) de los casos con AR, pero raramente resultan positivos si no existe AR, lo que supone una especificidad del 95% (Nishimura *et al.*, 2007) o incluso del 100% (Sackalingam *et al.*, 2009). Se ha demostrado que los ACPAs están presentes en muchos casos antes de la aparición de la enfermedad clínica, como sucede con los FR.

Actualmente, las pruebas más empleadas para la detección de ACPAs se basan en la utilización de proteínas recombinantes, con las que se han desarrollado procedimientos que ponen en evidencia la existencia de anticuerpos anti-CCP (péptido cíclico citrulinado), o anti-MCV (anticuerpos frente a la Vimentina citrulinada mutada). Recientemente se ha desarrollado una prueba para la detección precoz de AR, el test serológico POCT (test punto de cuidado, *point-of-care test*). Este ensayo combina la detección de FR y anti-MCV, obteniéndose una sensibilidad del 72% y especificidad del 99'7% (Luime *et al.*, 2010; Renger *et al.*, 2010).

Finalmente, se emplean diferentes procedimientos serológicos para determinar otras causas de AR, como lupus eritematoso, ratio de sedimentación eritrocitaria, proteína C-reactiva, recuento de proteínas totales sanguíneas, función renal, enzimas hepáticas, así como otros ensayos inmunológicos (anticuerpo antinuclear, ANA). La existencia de niveles elevados de ferritina pueden revelar hemocromatosis, una copia de AR, o ser un signo de la enfermedad de Still, una variante de AR juvenil frecuentemente seronegativa.

2.6.3. Diagnóstico diferencial

Se conocen diferentes condiciones médicas que pueden confundirse con AR, y es necesario distinguirlas en el momento del diagnóstico:

- ✓ Artritis inducida por cristales (gota y pseudogota): normalmente afectan a determinadas articulaciones y se pueden distinguir mediante la aspiración de líquido sinovial en caso de duda.
- ✓ Osteoartritis: con el examen bajo rayos X de las articulaciones afectadas y también con pruebas sanguíneas
- ✓ Lupus eritematoso sistémico: aparecen síntomas clínicos específicos y con pruebas sanguíneas (detección de anticuerpos frente ADN bicatenario)
- ✓ Enfermedad de Lyme: provoca artritis erosiva y se diferencia de AR por pruebas sanguíneas en áreas endémicas
- ✓ Artritis reactiva (antes Enfermedad de Reiter): afecta al talón, articulaciones sacro-ilíacas y articulaciones grandes de las piernas. Se asocia con uretritis, conjuntivitis, iritis, úlceras bucales sin dolor y queratoderma blenorrágica.
- ✓ Espondilitis anquilosante: incluye la médula espinal y se diagnostica con frecuencia en varones, aunque en el contexto de esta condición puede presentarse una poliartritis simétrica de pequeñas articulaciones similar a la AR.
- ✓ Hepatitis C: en el contexto de esta condición puede presentarse una poliartritis simétrica de pequeñas articulaciones similar a la AR. También se puede inducir FR.

Causas más extrañas que normalmente se comportan de forma diferente pero que pueden provocar dolores articulares:

- ◆ Sarcoidosis, amiloidosis y la enfermedad de Whipple
- ◆ Hemocromatosis
- ◆ Fiebre reumática aguda
- ◆ Artritis gonocócica

2.6.4. Relación entre autoanticuerpos y AR

a) FR

Algunas investigaciones han demostrado la utilidad del estudio de los niveles de FR para el cribado de una población en general, dado que el FR se detecta entre el 1-8% de las personas sanas, y este porcentaje aumenta en personas mayores de 60 años. Es importante destacar que los individuos asintomáticos, con títulos de FR mayores de 1/256 (Waalser-Rose) desarrollan la AR con una frecuencia 20 veces mayor que personas con FR. Al-Jabri *et al.* (2003) observaron que el 0'4% de una muestra de población de 1537 personas de Arabia Saudí que no presentaban sintomatología compatible con AR (*sanas*) tenía FR.

En un estudio con 91 pacientes, Ferreira *et al.* (2007) observaron que el 33% de los pacientes con artritis reumatoide eran positivos a la detección de IgM-FR, y concluyeron que esta técnica era particularmente útil para el diagnóstico de artritis reumatoide juvenil.

Walker *et al.* (1990) comprobaron que el 67% de los pacientes con AR eran positivos a la detección de IgM-FR por ELISA, por tan sólo el 33% si el diagnóstico se realizaba mediante aglutinación en látex (LAT), concluyendo que estas diferencias podían deberse a la concentración de FR en el suero.

En un estudio con 440 enfermos con procesos degenerativos y reumáticos, Aupperle *et al.* (1996) obtuvieron una sensibilidad muy similar con ELISA y aglutinación en látex, en tanto que la especificidad fue superior con esta última; estos autores concluyeron que ambas técnicas eran válidas para hacer un estudio inicial de FR, aunque podría ser interesante confirmarlas mediante nefelometría. Estos resultados corroboran los resultados obtenidos por Banchuin *et al.* (1992), quienes no obtuvieron ventajas con el ELISA respecto de la aglutinación en un ensayo con 77 enfermos de AR y 319 sanos. Bas *et al.* (2002) y Nikolaisen *et al.* (2005) tampoco observaron diferencias entre los resultados de nefelometría y aglutinación en la detección de FR.

Wolfe (1998) comparó los resultados de nefelometría y aglutinación en látex con sueros de 576 pacientes con alteraciones reumáticas, y obtuvieron una buena correlación ($r^2=0.872$), de modo que concluyeron que ambas técnicas proporcionaban resultados similares. De igual modo, Ulvestad *et al.* (2001) apreciaron que había coincidencia entre la aglutinación y la nefelometría, aunque esta última parece más segura. Por el contrario, Visser *et al.* (1996) compararon ambas técnicas, y probaron que la detección de FR por ELISA es una alternativa válida en comparación con el LAT.

Anuradha y Chopra (2005) desarrollaron un ensayo en el que compararon los resultados de la nefelometría cuantitativa y la aglutinación en látex para la detección de FR. Empleando sueros de 564 pacientes con AR y 155 testigos, obtuvieron resultados similares con ambas técnicas, recomendando la técnica de aglutinación para el diagnóstico rutinario. Estos resultados coinciden con los de Wolfe *et al.* (1991), quienes demostraron que la aglutinación era muy específica.

Lapin *et al.* (2005) comprobaron que el 68% de los pacientes con AR tenían FR, y sugirieron la utilidad de detectar anticuerpos anti-filaggrina porque facilita el diagnóstico precoz de AR, así como la detección de pacientes con curso agresivo de la enfermedad y pronóstico desfavorable.

Symmons (2007) afirmó que el FR es más sensible que el anti-CCP para establecer AR, pero menos específico, y propuso la medición de ambos para llegar a un diagnóstico más fiable.

b) anti-CCP

Nielen *et al.* (2004) comprobaron la presencia de FR y anti-CCP incluso 10 años antes de la demostración de la enfermedad clínica, lo que para estos autores sugiere que existen factores ambientales desencadenantes de los autoanticuerpos que actúan mucho antes de la aparición de la enfermedad. Rantapaa-Dahlqvist *et al.* (2003) destacaron la utilidad de la detección de autoanticuerpos para el diagnóstico precoz de alteraciones reumáticas. Algunos estudios llegan a la conclusión de que en la AR existe una fase de *autoinmunidad preclínica* caracterizada por un incremento del nivel de autoanticuerpos (Berglin *et al.*, 2004).

En un estudio desarrollado en Malasia para recabar información acerca de la prevalencia de anticuerpos frente a péptidos cíclicos citrulinados (CCP) en pacientes con AR y de la posible correlación entre los niveles de estos anticuerpos y el Índice de Actividad de la Enfermedad (Disease Activity Score, DAS), Sockalingam *et al.* (2009) no encontraron anticuerpos anti-CCP en los testigos (29). De los 51 casos con AR, 80.4% tenían anti-CCP, por lo que la sensibilidad resultó del 80.4% y la especificidad del 100%. Los niveles de estos

anticuerpos se correlacionaron significativamente con el FR, pero no con otros parámetros. Estos autores llegaron a la conclusión de que la detección de anti-CCP es más sensible que la de FR.

Barcelos *et al.* (2009) desarrollaron un estudio con objeto de estudiar la asociación entre la presencia de anticuerpos frente a péptidos cíclicos citrulinados y el FR en el síndrome primario de Sjögren (pSS). De este modo observaron que la prevalencia de FR IgM e IgA era similar en pacientes con pSS y AR. Sin embargo los pacientes con AR y síndrome secundario de Sjögren (sSS) mostraron una tendencia a presentar mayor positividad al FR. Se detectaron anticuerpos anti-CCP en 64'5% de los pacientes con AR y sólo en el 6'9% de los que tenían pSS. Entre los testigos sanos no se detectaron anti-CCP y los FR fueron insignificantes. Concluyeron que los anti-CCP podrían resultar útiles en la diferenciación entre casos con pSS y con AR más sSS. Pese a que no son útiles para el diagnóstico diferencial entre AR y pSS, los FR pueden tener un papel de pronóstico en la pSS.

Pietrapertosa *et al.* (2010) analizaron la utilidad diagnóstica de la detección de anticuerpos frente al péptido cíclico citrulinado 2 (anti-CCP2) en pacientes con alteraciones autoinmunes e inflamatorias. Establecieron que el punto de corte de 2.8 U/mL tiene la mayor fiabilidad de diagnóstico; un valor de anti-CCP2 >15 U/mL está asociado con un incremento en la verosimilitud de la enfermedad AR.

En un estudio para evaluar la prevalencia y el valor predictivo de la utilización de anti-CCP como un marcador para el diagnóstico del futuro desarrollo de AR, Emad *et al.* (2010) establecieron correlación entre la presencia de anti-CCP y el recuento de articulaciones inflamadas, duración de la rigidez matinal y cambios de erosión ósea. Se obtuvo una sensibilidad del 57%, especificidad del 37'9%, valor predictivo positivo del 65'1% y negativo del 39'3%. Los valores de sensibilidad y predictivo positivo fueron muy similares a los de FR. En pacientes con artritis indiferenciada, los anticuerpos anti-CCP pueden permitir la predicción de AR, permitiendo la aplicación precoz de decisiones terapéuticas individualizadas.

Singwe-Ngandeu *et al.* (2010) realizaron un ensayo para evaluar la aplicación diagnóstica de la detección de autoanticuerpos frente a proteínas/péptidos citrulinados (ACPA) y determinar la prevalencia de alelos epítomos compartidos con HLA-DRB1 en pacientes africanos con AR. Para ello, midieron anticuerpos anti-CCP2 y anti-CCP3, FR (IgM e IgA). El genotipado de alelos HLA-DRB1 se llevó a cabo mediante PCR. Los resultados mostraron que el ensayo para la detección de anti-CCP2 alcanzaba la sensibilidad más elevada (82%) y la especificidad (98%), con los valores predictivos positivo y negativo más altos (96% y 91%, respectivamente). El 30% de los casos con AR eran portadores de al menos una copia de

HLA-DRB1, en comparación con el 10% y el 14% de pacientes con otras enfermedades reumáticas inflamatorias y de individuos sanos, respectivamente. Llegaron a la conclusión de que los anticuerpos anti-CCP2 son marcadores útiles de AR en pacientes africanos.

Da Mota *et al.* (2010) analizaron 45 pacientes con AR precoz (manifestación de síntomas antes de los 12 meses), y midieron la presencia de FR y anti-Sa. En el momento del diagnóstico se observó que el 50% tenían FR, idéntico valor anti-CCP, por un 10% con anti-Sa. Después de 3 años, no se detectaron cambios en la prevalencia de FR ni en la de anti-CCP, pero el anti-Sa aumentó al 17'5%.

2.7. AR Y FORMAS PARASITARIAS.

Se ha demostrado que algunos pacientes presentan manifestaciones inflamatorias en las articulaciones que se deben a la existencia de *infecciones parasitarias en las que no hay presencia del parásito en el interior de la cavidad articular*, es decir, debidas a la liberación de antígenos parasitarios que inducen la formación de inmunocomplejos séricos que alcanzan el fluido sinovial (Doury, 1990). Este cuadro se conoce como *reumatismo parasitario*, y se cree que las personas afectadas tienen predisposición genética.

No existen muchos estudios acerca de la relación entre la presencia de animales/mascotas, contacto con productos de origen animal, y el desarrollo de FR. Bond *et al.* (1996) investigaron si los animales o productos de origen animal podían favorecer la aparición de AR, y llegaron a la conclusión de que los gatos puede ser reservorios de algunos agentes infecciosos (virus y parásitos) que estimularían el desarrollo de AR después de un periodo de latencia.

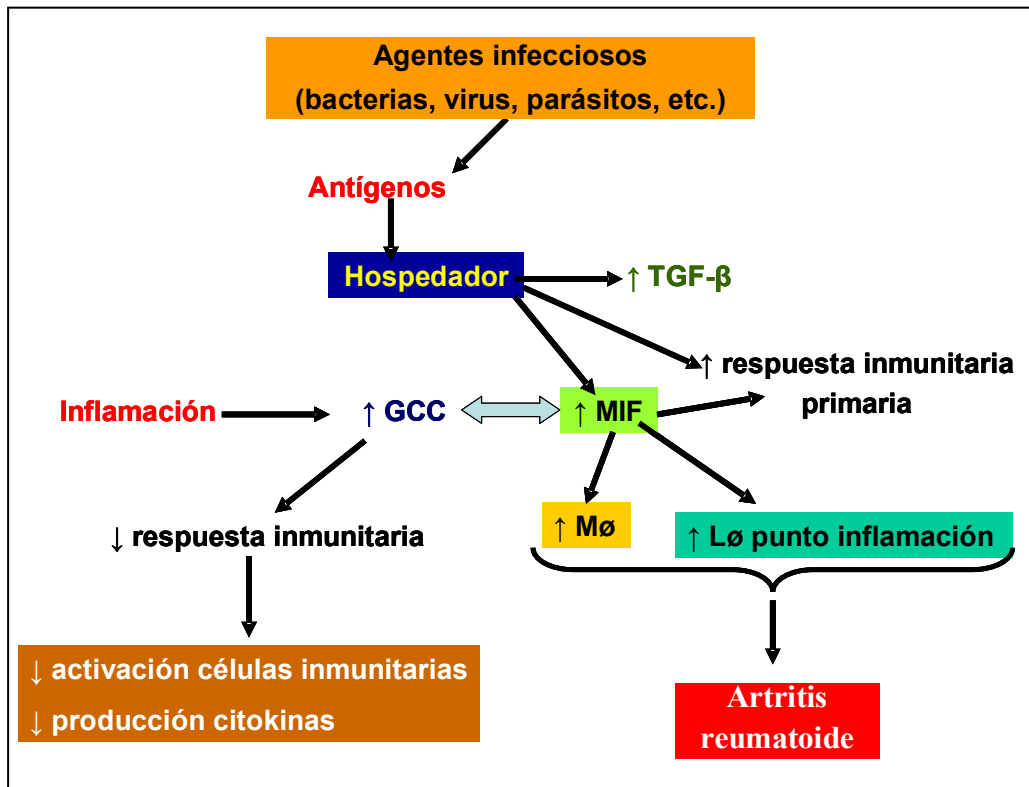
La coincidencia de artritis reumatoide, FR y de infecciones parasitarias se ha comprobado en pacientes con filariasis (Chaturvedi *et al.*, 1993), anisakiosis (Cuende *et al.*, 1998), esquistosomosis (Rolland *et al.*, 1998) y ascariosis (Carballada *et al.*, 1998) y strongiloidosis (Richter *et al.*, 2006).

De Corral *et al.* (1990) observaron un caso que presentaba fiebre, artralgias, artritis, leucocitosis e hipergammaglobulinemia, acompañado de FR, en el que diagnosticaron artritis reumatoide juvenil. Sin embargo, la presencia de eosinofilia les llevó a sospechar de toxocariosis, que confirmaron mediante la detección de valores elevados de anticuerpos frente a antígenos de *Toxocara canis* con una prueba ELISA.

Kaplan *et al.* (2005) desarrollaron un método para determinar la presencia de anticuerpos frente a *T. canis* en pacientes con AR, y observaron que la seroprevalencia de toxocariosis era significativamente superior en los casos positivos al proceso reumático.

En el 20% de pacientes con fasciolosis, Marcos *et al.* (2005) comprobaron que padecían artralgias, lo que corrobora los resultados obtenidos anteriormente por Sellami *et al.* (2003).

La asociación entre algunas parasitosis y la producción de FR y AR se puede resumir en el siguiente esquema:



Durante la infección parasitaria se liberan antígenos que, al entrar en contacto con el sistema inmune del hospedador, estimulan su respuesta inmunitaria celular y humoral. Como resultado, se producen diferentes citocinas y anticuerpos que dan lugar a la formación de inmunocomplejos, que, como se ha demostrado repetidamente participan de forma activa en la patogenia de la AR (Bacher *et al.*, 1996).

Kobayashi *et al.* (2004) investigaron la presencia de FR y eosinofilia en pacientes asmáticos, y observaron que en un grupo de pacientes positivos a FR la eosinofilia era significativamente superior a la de los FR negativo. También comprobaron en enfermos con cuadro intenso de asma, tratados con esteroides por vía inhalatoria, que los valores de FR eran significativamente superiores, y concluyeron que los resultados de FR reflejan la existencia de eosinofilia y de asma. Por el contrario, Bovin *et al.* (2004) no apreciaron diferencias en el grado de eosinofilia entre pacientes positivos a FR y los negativos.

2.8. HELMINTOSIS, INMUNIDAD Y TEORÍA DE LA HIGIENE

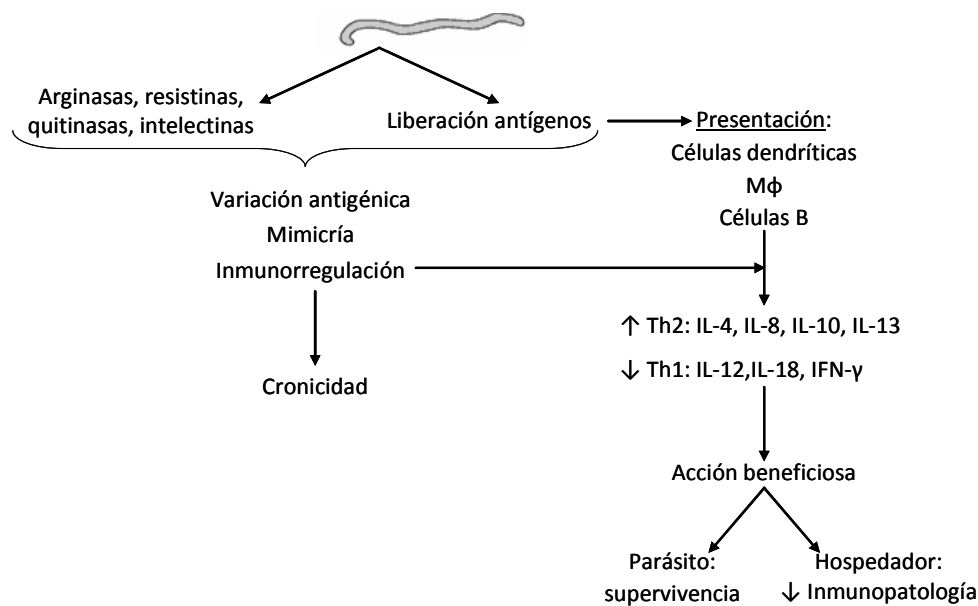
La infección por parásitos helmintos induce una respuesta inmunitaria en los hospedadores, que en las fases iniciales es de tipo Th1, caracterizada por la producción de IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , que es reemplazada por otra de tipo Th2, definida por la síntesis de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 que inducen la diferenciación de linfocitos B a la producción de anticuerpos IgE (Finkelman *et al.*, 2004; Pearce *et al.*, 2005).

Numerosos estudios han probado que los helmintos son capaces de modificar la respuesta inmunitaria de sus hospedadores, con el propósito de reducir su intensidad y de este modo favorecer su supervivencia. Entre los mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria más conocidos destacan la capacidad de interactuar con el sistema inmunitario mediante la inhibición de las respuestas celulares B y T vía inducción de células T reguladoras o de las citocinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF- β en la fase crónica de la infección (Maizels y Yazdanbakhsh, 2003).

Las esquistosómulas (fases juveniles de trematodos *Schistosoma* spp.) pueden alterar el funcionamiento del sistema del complemento (Ouaissi *et al.*, 1981) y degradar las inmunoglobulinas del hospedador (Auriault *et al.*, 1981), lo que puede debilitar una respuesta inmunitaria directa. Otro mecanismo consiste en el fenómeno de la *mimicría* molecular, por el que algunas formas parasitarias son capaces de presentar en su superficie (cutícula) moléculas de los hospedadores, incluyendo determinantes de los grupos sanguíneos y moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC), como sucede con las esquistosómulas (Maizels *et al.*, 1993). De este modo, se dificulta el reconocimiento por el sistema inmunitario del hospedador, facilitando la supervivencia de los parásitos.

La capacidad de sintetizar réplicas de citocinas del hospedador constituye un mecanismo muy útil para evadir su respuesta inmunitaria. Se ha descubierto que los huevos de *Schistosoma mansoni* secretan una quimocina ligante de proteínas (smCKP) que bloquea la migración de neutrófilos inducida por IL-8. En una forma recombinante purificada, la smCKP fue capaz de inhibir la inflamación neutrofílica dependiente de IL-10 (Smith *et al.*, 2005), lo que indica que esta molécula puede proteger al parásito de la respuesta inflamatoria.

Los helmintos también inducen otros moduladores inmunitarios como arginasas, resistinas (familia RELM), quitinasa e intelectinas. Estas moléculas menos estudiadas ayudan a regular las citocinas Th2, y la función de macrófagos y células epiteliales en puntos de inflamación de la mucosa (Nair *et al.*, 2006). Su función en la protección inmunitaria de enfermedades inmunitarias precisa de futuros estudios.



En las tres últimas décadas se ha observado un incremento dramático en la incidencia de enfermedades inflamatorias autoinmunes en los países desarrollados, entre las que se encuentran la diabetes de tipo 1 (T1D), la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn, entre otras (Gale, 2002). Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por un ataque inmuno-mediado sobre un órgano diana que ha dejado de ser reconocido como propio por el sistema inmunitario.

La patología autoinmune puede ser causada tanto por anticuerpos como por componentes mediados por células. La predisposición a la autoinmunidad está bajo control poligénico, pero algunos estudios en gemelos idénticos (homocigóticos) demostraron que los factores ambientales podían ser igualmente importantes (Kim y Polychronakos, 2005). La tendencia creciente esperada para las enfermedades autoinmunes en los próximos 30 años resultan catastróficas. Los países que han experimentado el incremento más pronunciado en autoinmunidad han hecho durante el mismo periodo mejoras significativas en el estatus sanitario y socioeconómico. Más aun, la migración estabilizada de áreas rurales a urbanas ha reducido de forma dramática la exposición de los niños a organismos infecciosos. La rápida transformación antropogénica del medio y del estilo de vida no ha dado tiempo suficiente para que el sistema inmunitario de los humanos se adapte a estos cambios. De este modo, las notables características del sistema inmunitario que previamente habían sido muy beneficiosas para combatir infecciones podrían ahora ser el principal factor que contribuye a la creciente prevalencia de enfermedades autoinmunes (Zacccone *et al.*, 2006).

Se ha sugerido que los adelantos en las condiciones de vida junto con la reducción de la exposición de los niños a patógenos, contribuyen a incrementar la atopía y la autoinmunidad

(Strachan, 1989). Esta es la *Hipótesis de la Higiene*, que ha suscitado en los últimos años interés y controversia por igual. Se trata de una hipótesis enunciada inicialmente por Strachan (1989) para la fiebre del heno, aunque posteriormente se desarrollaron estudios epidemiológicos adicionales para profundizar en la investigación de la relación entre este concepto de la higiene y la incidencia de otras enfermedades inmunitarias. Como consecuencia, se propuso la hipótesis de la higiene para otros padecimientos de naturaleza inmunitaria como asma y enfermedades alérgicas (Bach, 2002), cardiovasculares (Magen *et al.*, 2005), diabetes mellitus Tipo 1 (Cooke *et al.*, 2004) y esclerosis múltiple (Fleming y Cook, 2006), enfermedades extremadamente raras en la mayoría de las poblaciones africanas y asiáticas, y que aumentan considerablemente cuando estas mismas poblaciones migran a asentamientos más modernos (Chan-Yeung *et al.*, 2002). Similares resultados se han obtenido del estudio de la colitis ulcerosa, lo que refuerza la idea de que los cambios en el estilo de vida pueden ser la causa principal del incremento de la enfermedad en áreas con baja incidencia (Perzanowski *et al.*, 2002).



De acuerdo con la *hipótesis de la higiene*, la mayor prevalencia de las enfermedades autoinmunitarias está directamente relacionada con los mejores hábitos de higiénicos que se observan en los países desarrollados (Bresciani *et al.*, 2005). Se sugiere que la ausencia de exposición a agentes infecciosos como helmintos, resultado de la mejoría de los estándares de vida y de las condiciones médicas, modula el desarrollo del sistema inmunitario y de este modo incrementa el riesgo de enfermedades inmunitarias (Vercelli, 2006; Weinstock, 2006). Por todo ello, se puede concluir que la inmunomodulación provocada por los helmintos resulta beneficiosa a los hospedadores (personas) y a los parásitos, ya que podría protegerlos de su erradicación, y al mismo tiempo preservar al hospedador de respuestas pro-inflamatorias desmesuradas que pueden dañar los órganos. Parece bastante probable que la moderna ausencia diaria de exposición a helmintos intestinales es un factor ambiental importante que contribuye al desarrollo de algunos padecimientos como la colitis ulcerosa, de lo que se podría colegir que los helmintos regulan el sistema inmunitario de sus hospedadores y previenen el desarrollo de respuestas inmunitarias excesivas (Elliott *et al.*, 2000). Sin embargo, en opinión de algunos investigadores los datos que sustentan la participación de las helmintosis en la protección frente a la colitis ulcerosa son circunstanciales (Buening *et al.*, 2008).

Diferentes estudios han destacado el papel protector que ejercen las helmintosis sobre algunas enfermedades inmunitarias. Un estudio caso-control en Etiopía mostró que personas infectadas con nematodos desarrollaban asma con menor frecuencia (Scrivener *et al.*, 2001),

similares resultados se obtuvieron en Vietnam (Flohr *et al.*, 2006). Otro estudio sobre una población aleatoriamente seleccionada demostró que la terapia antihelmíntica repetida en niños de Gabón con helmintosis aumentaba la frecuencia de sensibilidad alérgica a los ácaros del polvo (van den Biggelaar *et al.*, 2004). La infección por *Schistosoma hematobium* induce una respuesta parásito-específica IL-10 en el hospedador y suprime la reacción atópica en niños gaboneses (van den Biggelaar *et al.*, 2001).

Se ha establecido una correlación entre la infección por *Trichuris trichiura* y la patogenia de la esclerosis múltiple, observándose que los pacientes de EM (esclerosis múltiple) que desarrollaron helmintosis durante el curso de su enfermedad mostraron menores exacerbaciones y desarrollaron menores lesiones nuevas en el cerebro, como se demostró mediante imágenes de resonancia magnética, en comparación con las personas EM no infectadas (Fleming y Fabry, 2007).

En los últimos años se han llevado a cabo algunos ensayos clínicos empleando helmintos para tratar la colitis ulcerosa, y los resultados sugieren que la infección con algunos helmintos mejora los resultados clínicos, lo que apoya la premisa de que la infección natural por estos parásitos es protectora. En experiencias con huevos viables de *Trichuris suis* administrados por vía oral se observó mejoría clínica en pacientes con colitis ulcerosa o con enfermedad de Crohn (Summers *et al.*, 2005)

La terapia con helmintos vivos parece ser efectiva en varias enfermedades inmunitarias. Aunque no se ha demostrado de forma fehaciente, la base de esta acción podría residir en la capacidad de modificar la respuesta que el sistema inmunitario presenta durante las helmintosis, de marcado carácter Th2. En algunos estudios se ha caracterizado la AR como una respuesta inmunitaria de tipo Th1 (Reckner *et al.*, 2001; Van Roon *et al.*, 2006; Mewar y Wilson, 2006), por lo que sus sustitución por otra de clase Th2 contribuiría a reducir sensiblemente las alteraciones debidas a este padecimiento.

El siguiente paso lógico, para evitar los posibles inconvenientes de un tratamiento con parásitos vivos, parece consistir en la identificación y caracterización de moléculas derivadas de helmintos con actividad inmunosupresora que contribuyen al efecto protector (Zaccone *et al.*, 2006).



3. Unidad temática

Las zoonosis son enfermedades transmisibles en condiciones naturales entre los animales y el hombre. Aunque la relación entre personas y animales es tan antigua como el propio origen del hombre, en la actualidad es muy frecuente la tenencia de mascotas dentro de las casas, en especial de perros y gatos. La tenencia de animales implica el compromiso de ofrecerles condiciones de vida adecuadas y de cuidar su salud. Al compartir la vida con un perro sano las personas disfrutan más de su compañía y disminuye el riesgo de contraer enfermedades zoonóticas, especialmente en el caso de los niños ya que ellos son los que menos precauciones toman al jugar con los animales. Entre las enfermedades parasitarias que afectan a los perros es preciso destacar por su elevada prevalencia, en especial entre cachorros, la toxocariosis (*Toxocara canis*), responsable en el ser humano de los casos de *larva migrans* ocular y visceral.

La toxocariosis se produce por la ingestión accidental de larvas 2 del nematodo que se encuentren ya viables en el interior de huevos eliminados con las heces del perro. Teniendo en cuenta que la compleja estructura de la cubierta trilaminar de los huevos les confiere una elevada resistencia, el control del riesgo biológico resulta esencial en cualquier instalación en la que se mantienen animales. En la mayoría de clínicas veterinarias, criaderos, etc., se lleva a cabo una limpieza mecánica y posterior desinfección, que reduce principalmente el riesgo de infección microbiana.

Se inició la presente investigación con un **primer estudio** orientado a determinar la capacidad de supervivencia de las formas infectantes de *T. canis* (larvas 2, L2) después de ser sometidos a la acción de algunos de los desinfectantes empleados de forma habitual en locales destinados a la cría o curación de perros. Para ello, se trataron huevos del nematodo con etanol, hipoclorito sódico y un desinfectante comercial (mezcla de cloruro de benzalconio y formaldehído). Del examen de los huevos al microscopio se concluyó que el etanol proporcionaba los mejores resultados *in vitro* dado que impedía su desarrollo hasta el estado de L2.

Con objeto de determinar si estos productos afectaban también a las L2, se planteó la administración a ratones de huevos embrionados con L2 que habían sido expuestos previamente a la acción de etanol, hipoclorito sódico o un desinfectante comercial (cloruro de benzalconio + formaldehído). Los ensayos *in vivo* mostraron que el hipoclorito sódico era más eficaz que la mezcla comercial, puesto que esta última no afectó a la viabilidad de las formas infectantes del nematodo. A la vista de estos resultados se concluyó que el empleo de etanol o hipoclorito sódico como desinfectantes es la mejor elección para lograr un efecto ovicida y larvicida de *T. canis*, y que su uso minimiza el riesgo de infección del personal que pueda estar en contacto con las fases infectantes del parásito.

Dado el carácter eminentemente ganadero de la Comunidad Autónoma Gallega, es importante tener en cuenta que este fenómeno puede ocurrir también por el contacto con animales de renta.

La cría tradicional de ganado porcino, consiste en el mantenimiento de un número reducido de animales en locales no siempre adecuados y que solo se limpian de forma *manual*, de modo que el manejo del estiércol puede favorecer el contacto con parásitos ascáridos como *Ascaris suum*. Hasta hace pocos años se consideraba que la ascariosis humana estaba provocada únicamente por *Ascaris lumbricoides*, atribuyéndose a la ingestión de huevos de *A. suum* un proceso de *larva migrans* cutánea en el peor de los casos. Sin embargo, recientemente algunos autores han denunciado la eliminación de huevos de *A. suum* en las heces de personas infectadas, por lo que han considerado que este parásito puede alcanzar el estado adulto en el hombre.

Las condiciones edafoclimáticas de Galicia, en general, propician el desarrollo de la fase externa del ciclo biológico del trematodo *Fasciola hepatica*. La fasciolosis es una infección muy frecuente en los rumiantes domésticos que la adquieren al ingerir metacercarias infectivas que se encuentran adheridas en las hojas de plantas de zonas encharcadas. Numerosas investigaciones han establecido una elevada correlación entre la infección de animales y personas, sobre todo en países en vías de desarrollo en los que la captación de agua no es la adecuada. Los adultos de *F. hepatica* se encuentran en los conductos biliares y vesícula biliar de personas infectadas, por lo que su diagnóstico se puede llevar a cabo por la técnica coprológica de sedimentación. En condiciones normales la carga parasitaria en las personas infectadas es reducida, lo que dificulta la observación de huevos del trematodo en las heces, y aconseja el diagnóstico de esta parasitosis por imagen o mediante técnicas inmunológicas.

Las infecciones por helmintos son excepcionales en personas de países desarrollados y suelen cursar de forma asintomática, convirtiéndose en un proceso subclínico que pasa a menudo desapercibido salvo que aparezcan complicaciones. Puesto que los seres humanos no son los hospedadores adecuados de los ascáridos, el diagnóstico de estas infecciones no se puede realizar por métodos tradicionales como la coprología. Con el propósito de mejorar las posibilidades de diagnóstico de las helmintosis, desde hace algunos años se vienen aplicando diversas técnicas para estudiar la respuesta inmunitaria humoral que tiene lugar en personas infectadas o expuestas a estos parásitos.

Ante la ausencia de datos actualizados acerca de la sensibilización de personas frente a antígenos de los zoohelmintos reseñados, se planteó un **segundo ensayo** en el que se analizó la presencia de anticuerpos IgG frente a antígenos de excreción/secreción de larvas 2 de los

nematodos *T. canis* y *A. suum*, y del trematodo *F. hepatica*, mediante una prueba inmunoenzimática (ELISA, *enzyme linked immunosorbent assay*), en el suero de habitantes de zonas rurales y urbanas. Se demostró la presencia de anticuerpos frente a algunos de estos helmintos en el 57% de la población estudiada, que resultó del 13% para la toxocariosis, 23% para la fasciolosis y 45% para la ascariosis. Los pacientes sensibilizados frente a los helmintos presentaron mayores cifras de neutrófilos. Se concluyó que las personas que residen en áreas rurales tienen mayor riesgo de exposición a los antígenos de los helmintos mencionados, destacando en especial la elevada probabilidad de sensibilización frente a *A. suum* en mujeres de áreas rurales. Estos resultados confirman que las posibilidades de contacto con diferentes antígenos guarda relación con el medio en el que se desenvuelven los individuos.

El descubrimiento de eosinofilia en pacientes humanos se ha relacionado con fenómenos de alergia, así como de infecciones parasitarias. En diversas investigaciones se ha señalado que ante la infección por helmintos se estimula la producción de anticuerpos y de algunos elementos celulares (linfocitos, eosinófilos, neutrófilos). Se ha demostrado que los helmintos tienen la capacidad de modificar la respuesta inmunitaria de sus hospedadores, modulándola de forma que pueden reducir su intensidad, o incluso inducir el desarrollo de fenómenos de autoinmunidad.

Con objeto de aclarar este aspecto, y teniendo en cuenta los resultados del segundo ensayo, se consideró muy útil e interesante plantear dos estudios más, para comprobar si existía relación entre la sensibilización a antígenos de parásitos responsables de helmintozoonosis, la existencia de eosinofilia y el desarrollo de autoinmunidad. En el **tercer estudio** se analizó la presencia de anticuerpos IgG frente a larvas 2 de *A. suum* en tres grupos de pacientes con eosinofilia; además, se investigó la posible existencia de autoanticuerpos Factor Reumatoide (FR-IgM). De este modo se confirmó que las mujeres que viven en el medio rural presentan una seroprevalencia elevada de anticuerpos frente al ascárido, en tanto que los valores más elevados de eosinofilia se observaron entre la población masculina. La explicación a estos resultados podría encontrarse en los hábitos de cría tradicional de los suidos en Galicia. Las mujeres suelen encargarse de la alimentación del ganado, y también de la elaboración de los productos alimenticios a partir de la carne de los animales, situaciones ambas que facilitan que su sistema inmunitario entre en contacto con antígenos de parásitos que afectan a los suidos.

El hallazgo de una correlación significativa y positiva entre el desarrollo de eosinofilia y de FR-IgM parece indicar que el desencadenamiento de estas respuestas puede tener un origen común, centrado en la exposición a los antígenos del helminto.

La fasciolosis (*Fasciola hepatica*) es una zoonosis actualmente clasificada como emergente en el grupo de enfermedades que también pueden adquirirse a través del agua. Aunque existen divergencias en este aspecto, lo que está ampliamente demostrado es que se trata de un parasitismo muy frecuente en herbívoros de áreas de clima continental, en las que la humedad constante y temperaturas moderadas a lo largo de todo el año favorecen el desarrollo de vegetación y de las formas infectantes del trematodo. La elevada correlación entre la infección en los animales y en personas, se hace particularmente evidente en países en vías de desarrollo, en los que crece el número de pacientes que se daganóstica cada año, por este motivo está clasificada como zoonosis emergente por la Organización Mundial de la Salud

El objetivo del **cuarto ensayo** consistió esencialmente en la determinación del porcentaje de población sensibilizada frente a *F. hepatica*, y la posible asociación con la aparición de eosinofilia y de FR-IgM. Los pacientes con mayor eosinofilia tuvieron los títulos más reducidos de anticuerpos frente al trematodo, resultado que descarta la utilidad de este signo en el apoyo del diagnóstico de fasciolosis humana.

La población femenina de zonas rurales alcanzó de nuevo los niveles más altos de seroprevalencia de IgG y del autoanticuerpo FR-IgM. La población femenina que habita en zonas rurales alcanzó de nuevo los valores más altos de seroprevalencia de IgG y del autoanticuerpo FR-IgM. Aunque la fasciolosis se adquiere al ingerir vegetales o agua contaminados con metacercarias, los datos obtenidos en este ensayo parecen indicar que en la realización de las labores agrícolas y ganaderas, las mujeres del medio rural tienen mayor riesgo de exposición a otros estadios del trematodo como por ejemplo los huevos (manipulación de estiércol), responsables de la sensibilización al facilitar la presentación de algunos antígenos a su sistema inmunitario.

De nuevo se corroboró que la presencia de eosinofilia guardaba relación con la síntesis de FR-IgM, lo que refuerza la hipótesis de un origen común a ambos. En términos de clasificación, la eosinofilia y la producción de anticuerpos IgG se consideran respuestas inmunitarias de tipo Th2, que son las más duraderas en los hospedadores frente a infecciones por parásitos helmintos. Es preciso puntualizar en primer lugar, que la primera respuesta que se instaura tras la infección por helmintos es de tipo Th1, que es reemplazada por otra de tipo Th2, esta secuencia parece obedecer al objetivo de reducir la infección original hasta una carga parasitaria *soportable* por el hospedador, y que no desencadene alteraciones patológicas tan graves que le provoquen la muerte.

En segundo lugar, hay que destacar la capacidad de los parásitos para sobrevivir en diferentes medios, incluido el interior de sus hospedadores, para ello han desarrollado

diferentes mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria. Entre éstos, cabe destacar la modulación/modificación de la actuación normal del sistema inmunitario, como por ejemplo la activación policlonal e inespecífica de linfocitos B, que se baraja como una de las posibles causas de producción de autoanticuerpos, y con ello de posible aparición de trastornos autoinmunitarios.

En tercer lugar, el propio funcionamiento del sistema inmunitario dificulta la explicación e interpretación de todos los signos mencionados. Mientras que la eosinofilia está directamente asociada a la existencia de infección, aumentando en las primeras fases para disminuir a continuación, la producción de anticuerpos, y en especial del idiotipo IgG experimenta una fase de crecimiento relacionada con la exposición antigénica, que es sustituida por otra *de meseta* que se mantiene prácticamente en ausencia de sensibilización, explicando la persistencia de valores elevados durante periodos de tiempo prolongados. Otro aspecto a considerar radica en los fenómenos de autoinmunidad, en los que el sistema inmunitario *reconoce* como extraños componentes que no lo son, iniciando una respuesta para su eliminación. En esta línea, la producción de autoanticuerpos podría estar ligada a una estimulación policlonal de linfocitos B, que provocaría la síntesis de anticuerpos que serían reconocidos como antígenos.

Algunos estudios han demostrado que la detección de autoanticuerpos FR puede ser un marcador del futuro desarrollo de padecimientos reumáticos. Pese a que inicialmente se llegó al convencimiento de que el diagnóstico de alteraciones del aparato locomotor como la Artritis Reumatoide se podía fundamentar en la detección de autoanticuerpos FR, hoy en día se ha demostrado que es necesario que concurren además otras alteraciones.

En el **quinto estudio** se planteó el estudio de la sensibilización frente a los zoohelminthos más prevalentes entre la población de la Comunidad Autónoma Gallega con artritis reumatoide (AR). El análisis simultáneo de los resultados en función del diagnóstico de AR, sensibilización a zoohelminthos y lugar de residencia, evidenció que la población con AR que habita en áreas rurales presenta el mayor riesgo de exposición a los antígenos de los helmintos parásitos.

La artritis reumatoide es un desorden crónico multi-sistémico en el que la matriz cartilaginosa se infiltra por tejido sinovial inflamado que finalmente destruye la articulación. No se conocen con detalle todos los mecanismos que dan lugar al proceso inflamatorio, pero se apunta entre ellos la participación de la respuesta inmunitaria, que puede iniciarse ante el contacto con antígenos de diferente origen. Después de su absorción a nivel intestinal, a través de soluciones de continuidad en la piel, o por inhalación, estos productos antigénicos podrían

pasar a la circulación sistémica y llegar así a las articulaciones donde, tras la activación de mastocitos, se inicia una respuesta inflamatoria exagerada.

Los resultados del presente estudio advierten del riesgo que afecta a la población femenina que reside en el medio rural, puesto que la posibilidad de desarrollar diferentes actividades agrícolas o ganaderas facilita su exposición a estos helmintos parásitos y a sus antígenos, lo que además de estimular una respuesta inmunitaria a veces inespecífica y no siempre protectora, podría desencadenar otra inflamatoria, que de tener lugar en las articulaciones, daría lugar a trastornos inicialmente imprevistos próximos por ejemplo a la artritis reumatoide. Al tratarse de un proceso crónico, no se detectaría después de bastante tiempo.

A case-control study to analyze the influence of the environment in human sensitization against helminth parasitic antigens

DIEZ-MORRÓNDO C.¹, SÁNCHEZ-ANDRADE E.¹, IBARRA P.², ARIAS M. S.³, SÁNCHEZ-ANDRADE A.¹, SUAREZ J. L.¹, FRANCISCO J. J.¹, ROMASANTA J.¹, MORRÓNDO P.¹, DIEZ-BARROS P.¹ and PAZ-SILVA A.¹

¹ Animal Health Dept., Epidemiology, Zoonoses and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary, University of Santiago de Compostela, 27002 Lugo (Spain)

² Rheumatological Diseases Department, Hospital Universitario A Coruña (Spain)

³ Rheumatological Diseases Department, Hospital Urdi-Lago (Spain)

ABSTRACT

The analysis of the possible association between the living-place and the presence of IgG antibodies against the parasitic helminths *Haemon conts*, *Ascaris suum* and *Fasciola hepatica* was carried-out. From March 2007 to January 2008, blood samples were collected from 1,206 persons and divided into different groups taking into account their habitat and gender. A modified enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to evaluate the presence of antibodies against the excretory/secretory antigens of the helminths (contaminated) was employed. The percentage of positive cases to *C. conts* was 17% (95% CI: 11-15), 47% (44-49) in *C. suum* and 27% (25-29) in *F. hepatica*. The percentage of sensitization was significantly higher in the women living in rural areas. The sensitized people reached the greatest values for eosinophilia. It is concluded that people living in rural regions have a higher risk for developing IgG antibodies directed with excretory/secretory antigens of *F. hepatica*, *C. suum* and *C. conts*. *Ascaris* Study data suggest that women living in rural regions are at increased risk for sensitization against *C. suum*.

Key words: Habitat, helminth sensitization, seroprevalence, gender, ELISA.

RESUMEN

En el presente trabajo se analiza la posible asociación entre el lugar de residencia y el desarrollo de anticuerpos IgG frente a los antígenos de excreción/secretión de *Haemon conts*. Asimismo se *Fasciola hepatica*. Entre marzo de 2007 y enero de 2008 se recogieron muestras de sangre de 1.206 personas que se agruparon en función del hábitat y el género. Se empleó un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para evaluar la presencia de anticuerpos frente a los antígenos de excreción/secretión de los helmintos (contaminados).

Recibido: 16 April 2010; Aceptado: 10 May 2010

Corresponding: Ana Sánchez-Andrade

Faculty of Veterinary, University of Santiago de Compostela, 27002 Lugo (Spain)
E-mail: asanchez-andrade@usc.es

38

Relationships between eosinophilia, anti-*Fasciola* IgG, and IgM rheumatoid factors, in urban and rural areas of north-western Spain

A. SÁNCHEZ-ANDRADE¹, J. L. SUÁREZ², M. ARIAS³, J. FRANCISCO¹, C. DIEZ¹, J. CORTÉS¹, A. ROMASANTA¹, P. MORRÓNDO¹, P. DIEZ-BARROS¹, A. PAZ-SILVA¹ and R. SÁNCHEZ-ANDRADE¹

¹Rheumatology Department, Hospital Xeral-Cala, Dr. Ochoa, s/n, 27004 – Lugo, Spain

²Animal Pathology, Epidemiology, Zoonoses and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Santiago de Compostela, Campus Universitario, s/n, 27002 – Lugo, Spain

³Rheumatology Department, Hospital Juan Canalejo, Xabois de Arriba, 84, 15006 – A Coruña, Spain

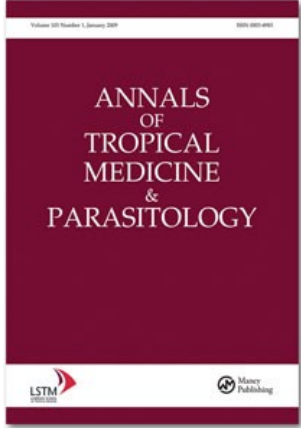
Received 14 September 2007; Revised 29 February 2008; Accepted 10 March 2008

A study was carried out, among adult patients attending a hospital in Lugo, in north-western Spain, to investigate possible relationships between eosinophilia, IgG antibodies against the parasite helminth *Fasciola hepatica*, and IgM rheumatoid factors (IgM-RF). Blood samples were collected from 1201 individuals and divided into three groups according to the number of cases: 400 *C. suum*, 400 *C. conts*, 400 *F. hepatica*. Each sample was checked for IgG against *F. hepatica* in an ELISA in which the seroprevalence of the antigen was used as the antigen, and the IgM-RF as a false antigen. The results were: 27% of the cases were found seropositive for *F. hepatica* and 15% were found to have IgM-RF. Women from rural areas were more likely to be seropositive than the other persons.

Keywords: IgG-RF, eosinophilia, *F. hepatica*, IgM-RF. Women from rural areas were more likely to be seropositive than the other persons. Conclusions: the positive blood seropositivity for *F. hepatica* was more likely than the seropositivity for IgM-RF. It is concluded that people living in rural regions have a higher risk for developing IgG antibodies directed with the parasite than those living in urban settings. The risk of developing eosinophilia appears to be positively associated with the presence of IgM-RF non-antibodies.

In humans, the diagnosis of many helminth infections is complicated by the non-specificity of the symptoms (fever, cough, myalgia, abdominal pain, anorexia, diarrhea) and signs (high eosinophil counts and increased enzyme levels). For example, are common in several parasitoses. Asymptomatic human infection may be common and go mostly undetected, unless antigen- or antibody-detection tests or molecular assays for the detection of parasite-specific DNA are employed. As many human infections with *Fasciola hepatica*, for example, are asymptomatic, or at least for long periods, the true extent of the public health problem posed by this parasite can often only be accurately assessed in cross-sectional surveys based on serology (Gillay and Ayo, 1997). Human *Fasciola*, a wide-spread zoonosis that is considered to be an emerging disease in many countries (O'Neill et al., 1999), is acquired by the ingestion of the metacercariae of *F. hepatica*, usually on salad leaves or other raw vegetables. Sheep and

Revised: 14 September 2007; Accepted: 10 March 2008
E-mail: asanchez-andrade@usc.es; Tel.: +34 982 252131
© 2008 The Authors. Journal of Tropical Medicine
DOI: 10.1017/S0950268808001777



Relationship among presence of antibodies against ascaris suum, eosinophilia and autoantibodies (igm-rf)

R. Sánchez-Andrade¹,
A. Sánchez-Andrade²,
J. L. Suárez³,
M. Arias³,
J. Francisco¹,
C. Diez¹,
A. Romasanta¹,
P. Morrondo¹,
P. Diez-Barros¹,
A. Paz-Silva¹

¹Department of Animal Pathology, Zoonoses, Epidemiology and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Santiago de Compostela, 27002 Lugo (Spain)

²Rheumatological Diseases Department, Hospital Urdi-Lago (Spain)

³Rheumatological Diseases Department, Hospital Juan Canalejo (A Coruña, Spain)

KEY WORDS: IgM-RF, habitat, gender, ascarid seroprevalence, eosinophilia

ABSTRACT

The possible association among the presence of IgG antibodies against the parasitic helminth *Ascaris suum*, eosinophilia, and that of IgM-rheumatoid factors (IgM-RF) was analyzed in blood samples from 1201 persons. These groups according to the values of eosinophilia were considered: normal (G.C. <0.5 109 L⁻¹), eosinophilia (G.C. 0.5-3 109 L⁻¹) and hyper-eosinophilia (G.C. >3 109 L⁻¹). The detection of IgG antibodies was done by using a modified enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with *A. suum*

excretory/secretory antigens, and IgM-RF autoantibodies by a latex agglutination test. Forty-one percent of the cases were positive to ascaris and 15% had IgM-RF autoantibodies. The greatest values were reached in women from rural areas. The highest percentages of eosinophilic patients were found in men from rural areas. A positive and significant association between eosinophilia and IgM-RF autoantibodies was observed. We concluded that people living in rural regions have a higher risk for developing IgG antibodies against *A. suum*.

INTRODUCTION

Diagnosis of several helminth zoonoses like

4. Publicaciones

MORRONGO P, DÍEZ-MORRONGO C, PEDREIRA J, DÍEZ-BAÑOS N, SANCHEZ-ANDRADE R, PAZ-SILVA A, DÍEZ-BAÑOS P. (2006). *Toxocara canis* larvae viability after disinfectant-exposition. **Parasitology Research**, 99: 558-561

Parasitol Res (2006) 99: 558–561
DOI 10.1007/s00436-006-0200-5

ORIGINAL PAPER

P. Morrondo · C. Díez-Morrondo · J. Pedreira ·
N. Díez-Baños · R. Sánchez-Andrade · A. Paz-Silva ·
P. Díez-Baños

***Toxocara canis* larvae viability after disinfectant—exposition**

Received: 14 February 2006 / Accepted: 31 March 2006 / Published online: 26 April 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract The effect of three routinely used disinfectants on the embryony development of *Toxocara canis* eggs was evaluated both in vivo and in vitro. In the in vitro experiment, *T. canis* eggs were treated with the ethanol, sodium hypochlorite, and one commercial mix of benzalconium chloride and formaldehyde, and the embryony development was assessed. After a period of 24 days incubation, ethanol was the best disinfectant because it prevented the development of the *T. canis* larvae 2 in the eggs, and sodium hypochlorite caused degeneration in 50% eggs. By using the commercial mix, 25% *T. canis* eggs developed to 2nd stage larvae. In the in vivo experiment, the embryonated eggs treated with the disinfectants were inoculated to mice, and their brain tissues were examined for larval presence on the 24th day postinfection. In addition, a control group was set up for comparison with the infected groups. No injury or *T. canis* larvae were observed in mice infected with sodium hypochlorite-treated eggs, opposite to that recorded in the animals infected with the commercial disinfectant-treated eggs. These results showed that both ethanol and sodium hypochlorite are very appropriate because of their full efficacy against infective *T. canis* eggs. Disinfection of kennels, animal shelters, cages, and veterinary clinics with one of these products to eliminate *T. canis* eggs and to avoid contamination is strongly recommended.

P. Morrondo (✉) · C. Díez-Morrondo · J. Pedreira ·
R. Sánchez-Andrade · A. Paz-Silva · P. Díez-Baños
Parasitology and Parasitic Diseases,
Department of Animal Pathology,
Faculty of Veterinary,
University of Santiago de Compostela,
Lugo, 27002, Spain
e-mail: mopela@lugo.usc.es
Tel.: +34-982-252350
Fax: +34-982-252195

N. Díez-Baños
Parasitology and Parasitic Diseases.
Department of Animal Health,
Faculty of Veterinary,
University of León,
León, 24071, Spain

Introduction

Toxocara canis (Werner 1782) is a very widespread nematode affecting dogs and cats, especially puppies. Humans can also be infected with second-stage larvae of *T. canis*, resulting in visceral larva migrans or VLM. Infection rates are higher than the normal population in adults who are occupationally exposed to dogs, such as dog breeders and animal hospital employees (Deutz et al. 2005). Children can become infected after accidentally ingesting (swallowing) infective *Toxocara* eggs from larvae in soil or other contaminated surfaces.

The eggs of *T. canis* are highly resistant to adverse climatic conditions, and they can survive in a suitable external environment for many years, becoming the source of infection both to animals and humans (Deutz et al. 2005). In conditions of suitable temperature (15–35°C), relative humidity higher than 85%, and oxygenation, after 2–5 weeks, the infective stage (L2) develops inside the egg, which is able for infecting definitive and paratenic hosts (mice, humans) (Gamboa 2005). The elevated resistance of the *T. canis* eggs has stimulated research on disinfection, which included the use of steam (van Knappen et al. 1979), X-ray and γ -ray radiations (Kamiya et al. 1987), and ozone (Korich et al. 1990; Finch et al. 1993).

Most serological studies on *T. canis* in humans have shown that 2–18% of the general population have positive antibody reactions against *T. canis* antigen using the enzyme-linked immunosorbent assay (Havasiova et al. 1993; Fenoy et al. 1996; Suárez et al. 2005). However, the number of cases diagnosed as *larva migrans* is much lower than expected from these prevalences, indicating that only a fraction of infections leads to clinical signs, and that hitherto unknown aspects of both parasite migratory behavior and host response may determine the severity of symptoms. Thus, a good animal model is required for experimental investigations on migrating larvae. Until today, mice have been used most often as a model for human visceral larva migrans (Bardón et al. 1994). The larvae can survive for a long period in this paratenic host, even for as long as one year.

The main goal in the current investigation was to evaluate the efficacy of three disinfectants routinely used to inactivate *T. canis* eggs and to avoid contamination in kennels and veterinarian clinics.

Materials and methods

In vitro assay

T. canis eggs obtained from female gravid uteri recovered from puppies naturally infected. For the in vitro assay, 400,000 eggs were homogenized and divided into four groups of 100,000 in each:

- ES *T. canis* eggs incubated in 5 ml 0.85% saline solution. This group was the control for the study of the normal embryonic development.
- ECD *T. canis* eggs incubated in 5 ml 0.1% commercial disinfectant (benzalconium chloride + formaldehyde, Desinplus Lamons, Lérida, Spain).
- ESH *T. canis* eggs incubated in 5 ml 2% sodium hypochlorite.
- EET *T. canis* eggs incubated in 5 ml 70% ethanol.

In all groups, the eggs were placed into Petri dishes with 50 µg ml⁻¹ de gentamicin and 50 IU ml⁻¹ nystatin for preventing bacterial and fungal contamination and incubated for 24 days at 32±1°C and 12-h light-dark cycles. Plates were daily shaken for allowing their oxygenation, and direct light on the eggs was avoided.

For a duration of 24 days, culture samples were obtained each 3 days for assessing the *T. canis* eggs development. We recorded the percentage of degenerated eggs also.

T. canis L2 viability was evaluated by pressing the cover-slip and by analyzing the larval motility after increasing the temperature.

In vivo assay

The viability of disinfectant-treated *T. canis* eggs was evaluated in 2-month male CD1 mice. Eggs-treated solutions were centrifuged at 500×g for 5 min. For each disinfectant solution, one study group was used. All mice were given a standard commercial diet with free access to water and maintained on a cycle of 12 h light:12 h dark at a room temperature of 20°C.

Mice were anesthetized with diethyl ether (Wako Chemical, Japan) and orally infected using a glass probe coated with silicon. The number of mice in each experimental group was different, according to the number of treated eggs. Fifty mice were divided into four groups:

- MS Fifteen mice infected with 2000 *T. canis* eggs incubated in 0.85% saline solution.
- MCD Thirteen mice infected with 2000 *T. canis* eggs incubated in 5 ml 0.1% commercial disinfectant (benzalconium chloride + formaldehyde, Desinplus Lamons, Lérida, Spain).
- MSH Seven mice infected with 1100 *T. canis* eggs incubated in 5 ml 2% sodium hypochlorite.
- MC Fifteen mice remained uninfected as controls.

Ethanol-treated eggs were not used for infecting mice because *T. canis* L2 did not develop in the presence of ethanol.

The livers, lungs, and spleen of the mice were removed to record the macroscopic injury. The brains were taken out and interposed between two slides to count the larvae. The examination for larvae was done immediately after the necropsy because there was the possibility as the mobility that the larvae might decrease and/or the larvae might die after some time (Satou et al. 2005). Necropsies were performed at 8, 20, and 30 days postinfection.

Statistical analysis

The statistical analysis was done using ANOVA, and significance was assessed at the $P<0.05$ level of confidence.

Results

In vitro assay

Table 1 reflects that most of the *T. canis* eggs remained in phase I or zygote after incubation with the different disinfectants, and the percentage of eggs with zygote was significantly lower in the saline solution-treated eggs.

The development of *T. canis* eggs in sodium hypochlorite (ESH) or in ethanol (EET) was very low, and small percentages reached the morula stage. *T. canis* larvae 2 were first observed on the 6th day in ESS and ECD, and on day 15th in ESH (Table 1). Larvae motility was observed since the 21st day in the EES and ECD groups.

At the end of the study (24th day), 34% of the eggs incubated in saline solution remained in phase I or zygote, 61% of the ECD, 35% of ESH, and 62% of EET. No L2 larvae were obtained after incubating the nematode eggs in presence of ethanol (EET), only the 8% of the EET reached the 2nd stage, and the greater values were obtained in the control group (ESS) and in that treated with the commercial disinfectant (ECD). ANOVA showed the differences among the different groups were significant.

In vivo assay

Macroscopic lesions were not observed in any of the mice infected with *T. canis* sodium hypochlorite eggs (MSH). The injury intensity was lower in the mice infected with *T. canis* eggs incubated with the commercial disinfectant. At necropsy, most injury was noted in the livers of mice from MSS and MSH, and milliard foci were recorded. In hemorrhagic areas, irregular fine white stippling was seen on the surfaces of lungs and kidneys. We observed also splenomegaly and petechial hemorrhages, and white milliard foci in the heart.

As expected, no sign of larval presence was detected in control animals and no larvae were recovered from the brains in the MSH. The percentage of larvae recovered in

560

Table 1 Embryonic development of *T. canis* eggs after incubation with saline solution (ES), a commercial mixture (ECD), sodium hypochlorite (ESH), and ethanol (EET)

Postinfection days	<i>T. canis</i> (%)	ES	ECD	ESH	EET
0	I	100	100	100	100
	II	0	0	0	0
	III	0	0	0	0
	IV	0	0	0	0
	V (L-2)	0	0	0	0
3	I	47.4	75.3	68.4	80.2
	II	1.5	2.3	0	1.5
	III	37.7	9.3	0	0
	IV	4	0.6	0	0
	V (L-2)	0	0	0	0
6	I	40.7	70.3	62.3	76.7
	II	10.8	2.5	5.6	6.6
	III	2.2	8.7	0	0
	IV	7	9.6	0	0
	V (L-2)	34.3	2.5	0	0
9	I	36.7	68.4	55.7	70.5
	II	1.2	1.3	9.5	8.3
	III	4.1	6.5	0	4.1
	IV	3.1	10.3	0	0
	V (L-2)	45.6	2.5	0	0
12	I	35.4	69.5	47.4	68.7
	II	0.6	1.5	7.8	6.5
	III	1.8	2.9	6.5	9.2
	IV	0.9	9.8	0	0
	V (L-2)	46.9	6.6	0	0
15	I	32.4	65.3	49.1	65.3
	II	0	0	3.4	5.7
	III	2.3	2.5	5.6	12.9
	IV	2.3	5.7	3.3	0
	V (L-2)	50.4	19.6	2.1	0
18	I	30.6	57.8	40.7	64.3
	II	0	0	1.2	6.5
	III	1.2	3.2	3.6	15.3
	IV	1.2	4.3	4.5	0
	V (L-2)	52.6	24.2	4.3	0
21	I	35.2	58.3	38.9	61.2
	II	0	0	0	4.5
	III	0.3	1.5	6.8	18.7
	IV	1.5	2.3	3.5	0
	V (L-2)	48.6	25.6	6.5	0
24	I	33.7	60.8	35	62.3
	II	0	0	0	3.8
	III	0	0	6.9	16.2
	IV	0	1.7	4.3	0
	V (L-2)	48.5	26.2	8	0

Results are percentages less the value of degenerated eggs

the MSS ranged between 7.9 and 27.8% (Table 2), and between 2.3 and 3.6% in the MCD. The highest average values were also recorded in the group of mice infected with saline solution-treated eggs (MSS). ANOVA showed

significant differences between the number of larvae recovered from MSS and MCD.

Discussion

Biological risk management is an essential component of keeping any veterinary facility as clean and secure as possible. Most of cleaning in veterinary hospitals consists of disinfection, which reduces the risk of infection from microbial contamination only.

T. canis eggs are very hazardous to humans, who are paratenic hosts, so contamination by them is a public health problem. Because *T. canis* can cause visceral larva migrans in humans and in animals, several studies on various methods of disinfections for its infective embryonated eggs have been reported. It is well known that with the help of a strong shell structure, *T. canis* eggs become very resistant to all environmental conditions and chemical agents (Ayçiçek et al. 2001). In the current paper, the effect of several disinfectants (ethanol, sodium hypochlorite, and a commercial mixture) on the *T. canis* egg viability was assessed. For this purpose, two experiences were carried out. Firstly, nonembryonated eggs were cultured in the presence of the above mentioned disinfectants. After a 24-day incubation period, no L2 larvae were collected by using the ethanol and a very low percentage in that done with sodium hypochlorite. Nevertheless, Ayçiçek et al. (2001) proved that sodium hypochlorite had no effect on *T. canis* eggs, thus confirming the results of Juris and Breza (1988). Likewise, at least 50% of the fertilized eggs preserved in 2% neutral formalin at 4°C for 21 months could fully embryonate and then have the same infectivity as embryonated fresh eggs (Chung et al. 2004).

For assessing the effect of the chemicals on the infectivity of nematode eggs, in a second experience, mice were infected with the *T. canis* 2nd stage after the incubation of the eggs with the disinfectants. It must be

Table 2 *T. canis* larvae recovered in mice infected with eggs incubated in saline solution (MS), a commercial mixture (MCD), and sodium hypochlorite (MSH)

Necropsy (days p.i.)	Group (number of mice)	Percentage	Average±S.D.
8	MS (5)	7.9	158±23
	MCD (4)	2.3	46±11
	MSH (2)	0	0±0
	MC (5)	0	0±0
20	MS (5)	15.8	317±28
	MCD (4)	1.4	28±9
	MSH (2)	0	0±0
	MC (5)	0	0±0
30	MS (5)	27.8	556±35
	MCD (5)	3.6	72±12
	MSH (3)	0	0±0
	MC (5)	0	0±0

Results are percentages and the average values

emphasized that *T. canis* eggs did not reach the 2nd stage in the presence of 70% ethanol. No larvae were recovered from the brains of mice infected with sodium hypochlorite *T. canis* eggs. Although a very low percentage of larvae were collected after the infection with the commercial mixture-treated eggs, determination of pathogenicity assessed by inflammatory injury as well as histopathological changes, revealed that L2 larvae attained the brain.

Very few chemical agents are effective against *T. canis* eggs. A 7% sodium hypochlorite is always recommended as a disinfectant agent against *T. canis* eggs in textbooks and papers (Ayçiçek et al. 2001). Ozone has been reported to be effective in inactivating cysts of *Giardia lamblia* or *Cryptosporidium parvum* (Korich et al. 1990; Finch et al. 1993). The use of ozone for sterilization is worth considering because it is composed of only oxygen and will always be decomposed into oxygen, and, thus, the question of polluting our environment or leaving a residual pollutant does not arise. Nevertheless, treatment with ozone did not reduce or inhibit the migration of *T. canis* larvae in mice (Ooi et al. 1998).

There are several broad spectrum disinfectants available for cleaning veterinary clinics, animal life science laboratories, and hospitals, and perhaps the most frequently used cleaning/disinfection combination used by veterinarians is bleach (sodium hypochlorite), made popular owing to the resistance of canine parvovirus. In the current study, the ethanol and the sodium hypochlorite were found to be effective against nonembryonated *T. canis* eggs, whereas all the other disinfectants were ineffective. These data were also confirmed by in vivo study, as no larvae were observed in mice inoculated orally with sodium hypochlorite-treated eggs. Our results support the use of ethanol or sodium hypochlorite for cleaning the veterinary clinics because of their ovicidal and larvicidal effect on *T. canis*.

Acknowledgement We thank B. Valcárcel for reading the manuscript.

References

- Ayçiçek H, Yarsan E, Sarimehmetoğlu HO, Tanyüksel M, Gırginkardeşler N, Özyurt M (2001) Efficacy of some disinfectants on embryonated eggs of *Toxocara canis*. *Turk J Med Sci* 31:35–39
- Bardón R, Cuéllar C, Guillén JL (1994) Larval distribution of *Toxocara canis* in BALB/c mice at nine weeks and one year post-inoculation. *J Helminthol* 68:359–360
- Chung LY, Fang BH, Chang JH, Chye SM, Yen CM (2004) The infectivity and antigenicity of *Toxocara canis* eggs can be retained after long-term preservation. *Ann Trop Med Parasitol* 98:251–260
- Deutz A, Fuchs K, Auer H, Kerbl U, Aspöck H, Köfer J (2005) *Toxocara*-infestations in Austria: a study on the risk of infections of farmers, slaughterhouse staff, hunters and veterinarians. *Parasitol Res* 97:390–394
- Fenoy S, Cuéllar C, Guillén JL (1996) Seroprevalence of toxocarasis in children and adults in Madrid and Tenerife, Spain. *J Helminthol* 70:109–113
- Finch GR, Black EK, Labatiuk CW, Gyurek L, Beloseciv M (1993) Comparison of *Giardia lamblia* and *Giardia muris* cyst inactivation by ozone. *Appl Environ Microbiol* 59:3674–3680
- Gamboa MJ (2005) Effects of temperature and humidity on the development of eggs of *Toxocara canis* under laboratory conditions. *J Helminthol* 79:327–331
- Havasiöva K, Dubinsky P, Stefancikova A (1993) A seroepidemiological study of human *Toxocara* infection in the Slovak Republic. *J Helminthol* 67:291–296
- Juris P, Breza M (1988) Trials with the disinvasive efficiency of some disinfectants in the laboratory conditions. *Helminthologia* 25:309–331
- Kamiya M, Ooi HK, Nomura T (1987) The effect of radiation on the viability and migratory ability of second-stage larvae of *Toxocara canis* in mice. *Vet Parasitol* 24:87–92
- Korich DG, Mead JR, Madore MS, Sinclair NA, Sterling CR (1990) Effect of ozone, chlorine dioxide, chlorine and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Appl Environ Microbiol* 56:1423–1428
- Ooi HK, Lin CL, Wang JS (1998) Effect of ozone treatment on *Toxocara canis* eggs. *J Vet Med Sci* 60:169–173
- Satou T, Horiuchi A, Akao N, Koike K, Fujita K, Nikaido T (2005) *Toxocara canis* I: search for a potential drug amongst B-carboline alkaloids in vitro and mouse studies. *Exp Parasitol* 110:134–139
- Suárez JL, Díez-Morrondo C, Sánchez-Andrade R, Romasanta A, Sánchez-Andrade A, Paz A, Díez-Baños P, Morrondo P (2005) Detección de anticuerpos frente a *Toxocara canis* en pacientes con eosinofilia. *Acta Parasitol Port* 12:437–438
- World Health Organization (1993) Guidelines for drinking-water quality, 2nd edn, vol. 1 Recommendations

DÍEZ-MORRONGO C, SÁNCHEZ-ANDRADE R, IBASETA P, ARIAS, MS, SÁNCHEZ-ANDRADE A, SUÁREZ JL, FRANCISCO I, ROMASANTA A, MORRONGO P, DÍEZ-BAÑOS P, PAZ-SILVA A. (2010). A case-control study to analyze the influence of the environment in human sensitization against helminth parasitic antigens. **Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología**, 69: 38-44.

Artículo de Original

A case-control study to analyze the influence of the environment in human sensitization against helminth parasitic antigens

DÍEZ-MORRONGO C.², SÁNCHEZ-ANDRADE R.¹, IBASETA P.¹, ARIAS M. S.¹, SÁNCHEZ-ANDRADE A.³, SUÁREZ J. L.¹, FRANCISCO I.¹, ROMASANTA A.¹, MORRONGO P.¹, DÍEZ-BAÑOS P.¹ and PAZ-SILVA A.¹

¹ Animal Health Dept., Epidemiology, Zoonoses and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary, University of Santiago de Compostela. 27002 Lugo (Spain).

² Rheumatological Diseases Department, Hospital Universitario A Coruña (Spain).

³ Rheumatological Diseases Department, Hospital Xeral Lugo (Spain).

ABSTRACT

The analysis of the possible association between the living-place and the presence of IgG antibodies against the parasitic helminths *Toxocara canis*, *Ascaris suum* and *Fasciola hepatica* was carried out. From March 2007 to January 2008, blood samples were collected from 1,206 persons and divided into different groups taking into account their habitat and gender. A modified enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to evaluate the presence of antibodies against the excretory/secretory antigens of the helminths (sensitization) was employed. The percentage of positive cases to *T. canis* was 13% (95% CI, 11-15), 45% (44-49) to *A. suum* and 23% (21-25) to *F. hepatica*. The percentage of sensitization was significantly highest in the women living in rural areas. The sensitized people reached the greatest values for neutrophils. It is concluded that people living in rural regions have a higher risk for developing IgG antibodies detected with excretory/secretory antigens of *T. canis*, *A. suum* and *F. hepatica*. Study data suggest that women living in rural regions are at increased risk for sensitization against *A. suum*.

Key words: Habitat, helminth sensitization, seroprevalence, gender, ELISA.

RESUMEN

En el presente trabajo se analiza la posible asociación entre el lugar de residencia y el desarrollo de anticuerpos IgG frente a los antígenos de excreción/secreción de *Toxocara canis*, *Ascaris suum* y *Fasciola hepatica*. Entre marzo de 2007 y enero de 2008 se recogieron muestras de sangre de 1.206 personas que se agruparon en función del hábitat y el género. Se empleó un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para evaluar la presencia de anticuerpos frente a los antígenos de excreción/secreción de los helmintos (sensibilización).

Received: 16 April 2010. Accepted: 10 May 2010.

Corresponding: Rita Sánchez-Andrade.

Faculty of Veterinary, University of Santiago de Compostela. 27002-Lugo (Spain).

Tel.: 0034982285900

E-mail address: rita.sanchez-andrade@usc.es

ENVIRONMENT AND HUMAN SENSITIZATION TO HELMINTH

El porcentaje de casos positivos a *T. canis* fue 13% (95% CI, 11-15), 45% (44-49) a *A. suum* y 23% (21-25) a *F. hepatica*. El porcentaje de sensibilización resultó significativamente superior en las mujeres del ámbito rural. Los pacientes sensibilizados frente a los helmintos presentaron los recuentos más elevados de neutrófilo y el riesgo de desarrollo de anticuerpos IgG frente a los antígenos de *T. canis*, *A. suum* y *F. hepatica* fue superior en la población de áreas rurales. Las mujeres residentes en zonas rurales alcanzaron un mayor riesgo de sensibilización frente a *A. suum*.

Palabras clave: Hábitat, sensibilización a helmintos, seroprevalencia, sexo, ELISA.

INTRODUCTION

In the last decades, people are changing their way of life, and movements from rural areas to urban ones and viceversa have occurred (Chaudhry *et al.*, 2009). The changes in the living-place can enhance the contact with different pathogens and antigens, especially for the different possibility for the presence of different species of animals, which can have some bearing on the humoral immune response (Allende *et al.*, 2008).

Zoonoses are diseases transmittable among people and vertebrate animals, and their importance and distribution is increasing in the last years. There are different methods of transmission for different diseases. In some cases, zoonotic diseases are transferred by direct contact with infected animals, much as being near an infected human can cause the spread of an infectious disease. Other diseases are spread by drinking water that contains the resistance stages of parasites (Marcos *et al.*, 2006). Still others are extended by eating the flesh of infected animals, and others by insect vectors.

There are many parasitic helminth-zoonoses and several differences observed in the relationship between humans and animals by considering the living-place. Usually, people from the towns have a closest relation to pets (dogs, cats). Dogs are the most common pet animals worldwide. They may harbour a wide range of parasites with zoonotic potential, thus causing a health risk to humans (Ugbomoiko *et al.*, 2008). Toxocariosis is a zoonosis transmitted by the accidental eating of eggs with the infective stage larvae of *Toxocara canis*, mainly in soil or other contaminated surfaces (Despommier, 2003). Puppies usually contract the parasite from the mother before birth or from her milk. When the pup is 3 to 4 weeks old, they begin to produce large numbers of eggs that contaminate the environment through the animal's stool. The

eggs soon develop into infective larvae.

People living in rural areas are in marked contact to animal livestock (cattle, pigs, sheep) (Gray *et al.*, 2007). The species *Ascaris lumbricoides* is probably the most familiar parasite in humans. An almost identical worm, *A. suum*, occurs in pigs. The association between *Ascaris* infections in Danish patients and contact with pigs or pig manure has been reported (Nejsum *et al.*, 2005, 2006).

Fasciolosis is a widespread zoonosis acquired by ingestion of *Fasciola hepatica*-metacercariae in infected raw vegetables. This helminthosis affects mainly domestic and wild ruminants, horses and pigs, and it has been considered by the WHO as an emerging human disease in many countries (O'Neill *et al.*, 1999). The correlation among the presence of positive antibody values against the *Fasciola hepatica* excretory/secretory antigens and that of IgM-Rheumatoid Factor has been recently proved (Sánchez-Andrade *et al.*, 2008).

The main objective in the current work was to analyze the possible influence of the living-place on the sensitization detected by using antigens of *T. canis*, *A. suum* and *F. hepatica*. For this purpose, a serological survey was conducted and serum samples analyzed by using a modified ELISA with excretory/secretory antigens. The changes in the blood parameters were also recorded. Results were analyzed according to the gender and the residence place of the individuals.

MATERIAL AND METHODS

Sera collection: Sera from 1,206 adult individuals were randomly collected from the Hospital Xeral (Lugo, Spain) between people who had not previously manifested any parasitological signs. One fecal sample was collected for each person and analyzed in the Hospital by means of the flotation

C. DÍEZ MORRÓNDO *et al.*

and sedimentation coprological probes. Parasitological positive results were not achieved. Table 1 reflects the distribution of the samples according to their sex and residence place.

Patients living in the city of Lugo were considered urban people, whereas persons living in country areas far away than 20 km were considered country population.

Excretory/secretory antigen preparation:

The preparation and use of excretory/secretory antigens from *T. canis* (TES) and *F. hepatica* (FES) was based on prior reports (Romasanta *et al.*, 2003; Sánchez-Andrade *et al.*, 2008).

For the collection of excretory/secretory antigens from *A. suum* (AES), adult worms were collected from swine guts at the slaughterhouse and washed several times in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.5). Females were identified and dissected under stereomicroscope, and *A. suum*-eggs collected from their uteri. These eggs were incubated at $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ and 12h dark/light cycles during 21 days.

After mechanical disruption of the eggs for obtaining the L2, the larvae were finally incubated in RPMI medium at 37°C and 5% CO_2 atmosphere for 6 hours. Debris were removed by sieving and centrifugation, and the supernatant containing AES products was collected and lyophilised. The protein concentration was estimated by the BCA technique described by Pierce®.

Detection of IgG against the antigens: The antibody levels against the parasitic antigens were established by means of an indirect-ELISA. Wells of micro-plates were coated with 100 μl each antigen (2 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and incubated overnight at 4°C . Blocking of excess-binding sites was performed by incubation with 250 μl of PBS containing 0.05% Tween and 1% skimmed milk (PTM) for 30 min at 37°C . Human sera diluted in PTM were added in duplicate to the wells and incubated for 1 h at 37°C . After 6 washings 100 μl of horseradish-peroxidase-conjugated (HRP-conjugated) sheep anti-human IgG (H&L chains, Nordic Immunology Laboratories, Tilburg, Netherlands Nordic Immunology) were added diluted in PTM and incubated for 1 h at 37°C . 100 μl of substrate consisting of 10 mg of *ortho*-phenylenediamine in 12 ml citrate buffer (pH 5.0) and 10 μl of 30% H_2O_2 were added to

Table 1. Distribution of the blood samples analyzed in the current investigation by considering the gender and the place where the patients are living (n= 1,206)

	Female	Male	Total
Rural	428	284	712
Urban	268	226	494
	696	510	1,206

each well. The plates were incubated in the dark for 15 min at room temperature. The colour reaction was stopped by addition of 100 μl of 3N H_2SO_4 , and absorbances were read using a spectrophotometer (Titertek Multiskan) at 492 nm.

In order to establish the cut-off point, positive values were the mean optical density (OD) of all negative sera plus three standard deviations (Sánchez-Andrade *et al.*, 2008). Thus, positive absorbance values were 0.3845 for toxocariosis, 0.3978 for ascariosis and 0.3144 for fasciolosis.

Sensitization was considered when serum positive to one of the antigens employed.

The presence of cross-reaction was assessed by testing sera from 18 patients who were detected fasciolosis by coprology and 26 negative patients, and only 1 of the individuals with fasciolosis was also positive to TES and AES, whereas none of the *Fasciola*-negative sera reacted with these antigens.

By the same way, 19 sera from patients with ocular toxocariosis were tested against the AES and FES antigens, and a positive reaction was noted in 1 of them, respectively.

Blood parameters: The values for the red and white cell parameters were established by using an automated cell-counter (Sysmex).

Statistical methods: Statistical analysis was conducted using ANOVA (significance limit at $p = 0.05$). The non-parametric Spearman's correlation test was applied to evaluate the existence of correlation among the different variables considered. All tests were performed by the statistical package SPSS, version 15 (SPSS Inc., 2008).

The association among the presence of antigens against the three helminth parasites and the environment and the gender of the patients was established by the estimation of the values of odds ratio (Thrusfield, 2005).

ENVIRONMENT AND HUMAN SENSITIZATION TO HELMINTH

RESULTS

Sensitization: The percentage of patients with positive antibody values against some of the helminths analyzed (*T. canis*, *A. suum* and *F. hepatica*) was 57% (95% CI, 54-60). The seroprevalence of IgG against TES was 13% (11-15), 45% (44-49) to AES and 23% (21-25) to FES. Table 2 summarizes the values of the haematic parameters according to the sensitization of the patients. The highest values for the neutrophils, basophils, erythrocytes and haematocrit in the sensitized people were obtained, but significant differences were observed only for the neutrophils.

greater percentage of sensitization was observed in the people from rural areas (63%; 60 - 66) than those from urban zones (48%; 45 - 51) ($\chi^2 = 29.375$, $p = 0.001$) (Table 3). The seroprevalence of toxocarioris, ascariosis and fasciolosis was also significantly highest in the people living in rural areas.

Table 3 reflects that the values of absorbance against the three antigens employed were significantly greatest in the countryside patients.

The highest numbers for neutrophils, erythrocytes, haemoglobin and haematocrit were matched in the patients from the rural areas (Table 2), whereas the lymphocytes were statistically greatest in the urban people.

Influence of the living-place: A significant

Effect of the gender: Sixty-one percent (58-

Table 2. Average values for the blood parameters (n = 1,206)

Sensitization		leuk (10 ³ /ml)	neut (%)	limph (%)	eosin (%)	mono (%)	baso (%)	eritr (10 ⁶ /ml)	hgb (g/dl)	hct (%)
Negative	Mean	7.04	42.77	32.95	14.44	8.34	1.02	4.48	13.66	39.84
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	SD	2.06	9.98	9.05	4.96	2.54	1.14	0.59	1.74	4.94
Positive	Mean	6.91	44.78	31.93	14.10	8.06	1.11	4.52	13.64	40.05
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	SD	1.85	9.14	8.56	4.83	2.20	1.31	0.54	1.71	4.45
Statistical Análisis	F	0.995	10.711	3.216	1.403	3.326	1.302	1.073	0.064	0.473
	P	0.319	0.001	0.073	0.236	0.069	0.254	0.301	0.800	0.492
Living-place										
Rural	Mean	6.94	44.60	31.87	14.22	8.08	1.05	4.58	13.86	40.72
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	SD	1.83	8.99	8.06	5.03	2.37	1.09	0.45	1.55	3.93
Urban	Mean	7.00	42.97	33.09	14.30	8.32	1.12	4.39	13.32	38.80
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	SD	2.11	10.27	9.74	4.69	2.30	1.44	0.68	1.92	5.39
Statistical Análisis	F	0.219	6.927	4.543	0.080	2.468	0.648	26.233	24.141	41.628
	P	0.640	0.009	0.033	0.777	0.116	0.421	0.000	0.000	0.000
Gender										
Women	Mean	6.81	44.06	32.46	13.90	8.17	1.16	4.41	13.39	39.10
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	SD	1.90	9.41	8.63	3.92	2.38	1.45	0.54	1.53	4.35
Men	Mean	7.18	43.81	32.20	14.72	8.18	0.96	4.63	14.02	41.20
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	SD	1.98	9.73	8.99	5.93	2.30	0.86	0.56	1.91	4.81
Statistical Análisis	F	8.853	0.172	0.203	8.351	0.007	5.826	35.844	32.460	50.926
	P	0.003	0.678	0.652	0.004	0.933	0.016	0.000	0.000	0.000

C. DÍEZ MORRONDO et al.

Table 3. Seroprevalence of IgG antibodies against the excretory/secretory antigens of *T. canis*, *A. suum* and *F. hepatica*, average values of optical densities and OR values (n = 1,206)

		Habitat						
		Rural			Town			
Antigen		Women	Men	Total	Women	Men	Total	Statistics
TES	Positive cases	64	44	108	24	22	46	$\chi^2 = 8.981$ P= 0.001
	OR	1.8						
	(x ± SD)	1.042 ± 0.563	0.978 ± 0.581		0.831 ± 0.444	0.834 ± 0.467		F= 8.981 P= 0.001
AES	Positive cases	216	140	356	136	52	188	$\chi^2 = 16.801$ P = 0.001
	OR	1.6				1.7		
	(x ± SD)	0.827 ± 0.391	0.842 ± 0.399		0.813 ± 0.337	0.612 ± 0.246		F = 16.801 P = 0.001
FES	Positive cases	122	64	186	40	48	88	$\chi^2 = 11.470$ P = 0.001
	OR	1.6						
	(x ± SD)	0.827 ± 0.434	0.814 ± 0.495		0.742 ± 0.423	0.750 ± 0.437		F= 11.470 P = 0.001

64) of the samples from women were positive to sensitization, by 52% (49 - 55) belonging to men (Table 3). These differences were significant ($\chi^2 = 10.067$, $p = 0.002$). The presence of significant differences by considering the gender of the patients was observed against AES only ($\chi^2 = 19.866$, $p = 0.001$), and a higher seroprevalence in women (51%, 48-54) than in men (38%, 35-41) was matched.

The intensity of the IgG response was greater in women than in men, but these differences were significant for ascariasis only (Table 3).

Women reached the highest values for neutrophils, lymphocytes and basophils, and statistical differences for the basophils were only obtained (Table 2). The values for leukocytes, eosinophils, erythrocytes, haemoglobin and haematocrit were significantly greatest in men.

Statistical analysis: A highest risk for sensi-

tization was obtained in the patients living in the countryside (OR = 1.9; $\chi^2 = 29.375$, $P = 0.001$), and in the women (OR = 1.45; $\chi^2 = 10.067$, $P = 0.002$). Table 3 summarizes that significant OR values for the seroprevalence of toxocarosis, ascariasis and fasciolosis were observed in rural patients.

Women exhibited the greatest risk for the sensitization and for developing positive antibody values against AES also.

In the rural patients, a statistical correlation was established among the absorbances against TES and the percentages of neutrophils ($r^2 = 0.107$, $P = 0.008$), lymphocytes ($r^2 = -0.096$, $P = 0.019$) and monocytes ($r^2 = -0.126$, $P = 0.008$).

The analysis of the blood parameters belonging to urban citizens showed significant correlations among the values of IgG against TES and lymphocytes ($r^2 = 0.132$, $P = 0.009$) and monocytes ($r^2 = 0.107$, $P = 0.036$); against AES and leukocytes ($r^2 = -0.140$, $P = 0.006$), monocytes ($r^2 = -0.104$,

ENVIRONMENT AND HUMAN SENSITIZATION TO HELMINTH

$P = 0.039$), and eosinophils ($r^2 = -0.105$, $P = 0.020$); against FES and neutrophils ($r^2 = -0.205$, $P = 0.0018$), neutrophils ($r^2 = 0.125$, $P = 0.014$), lymphocytes ($r^2 = 0.118$, $P = 0.020$), eosinophils ($r^2 = 0.168$, $P = 0.001$) and basophils ($r^2 = 0.146$, $P = 0.001$).

DISCUSSION

The possibilities for contacting with different pathogens and antigens can be influenced by the environment (MacPherson, 2005). There is a very spread belief of that a healthier habitat can be found in rural areas, without air or water pollution, non-stress conditions and enjoying for a natural environment. Nevertheless, under these conditions, the contact with different species of farm animals could be enhanced, and with some pathogens or their antigens belonging to these animals also (Martens & Böhm, 2009).

In the current investigation, the possible influence of the place where patients are living on the development of a humoral immune response against *T. canis*, nematode frequently affecting puppies, and *A. suum* and *F. hepatica*, helminths associated to pigs and ruminants, was analyzed. A significantly greater risk of sensitization in the rural people was achieved, according to previous investigations carried out in different areas (Gray *et al.*, 2007). In some Peruvian areas, Marcos *et al.*, (2006) suggested that human fasciolosis should be suspected in patients from livestock-rearing areas, due to the increment in the presence of infected ruminants grazing in the pastures which could contaminate water and/or plants, or to the fertilization with manure from those animals also. In previous works carried out in the same area of study, an elevated prevalence of fasciolosis was recorded in cattle (70%) and sheep (55%) (Sánchez-Andrade *et al.*, 2000; Paz-Silva *et al.*, 2003).

The greatest seroprevalence of ascariasis in the rural population could be explained by the enhanced opportunity to get in touch with the definitive hosts for these helminths, the domestic pigs. *A. suum* is the common ascarid roundworm in the swine livestock, and the presence of 2nd stage infective larvae is too frequent not only in the manure from infected animals, but on the skin of the infected animals also. It is to be noteworthy that

several investigations have shown the infection by *A. suum* in Danish patients in contact with pigs or pig manure (Nejsum *et al.*, 2005; 2006). In the area where this research was conducted (NW Spain), women are responsible for feeding and managing pigs, mainly fattening animals, which seems to be the explanation for a greater risk for developing IgG antibodies to *A. suum*.

It is normally believed that urban people take more care for dogs and cats, and an exaggerated and non-desirable contact with pets is frequently reported among this population. Nevertheless, one interesting finding was the observation of elevated seroprevalence of antibodies against *Toxocara* in people living in rural areas, which agrees with Ljungström & Van Knapen (1989) in Sweden and Zwoliński (2000) in Poland. It is necessary to take into consideration that infection by *T. canis* affects mainly puppies, and human infections develops by the accidental ingestion of soil contaminated with infective eggs, so children are the population in risk mainly (Ferreira *et al.*, 2007).

The possible cross-immunity against the antigens of *A. suum* and *A. lumbricoides* has been previously stated (Wossene *et al.*, 2002), and that against *T. canis* and *A. suum* (Nunes *et al.*, 1997) also, and thus might influence the interpretation of the results obtained in the current investigation. There is no information regarding the infection of people by *A. lumbricoides* in the area of study, however none of the persons were positive to the coprological methods. In a previous research conducted in the same region, a very low percentage of cross-immunity against *T. canis* and *A. suum* was obtained (6%) (Ibaseta, 2009).

Infection with helminth parasites induces a humoral immune response due to the activation of B cells (Wynn, 1997). In our investigation, the percentage of neutrophils was significantly increased in the sensitized patients, and a positive and significant correlation between the neutrophils and the IgG against *T. canis* in the people from the countryside was also matched. Nevertheless, urban persons showed a significant correlation between the percentages of lymphocytes and the absorbances against *T. canis*. Another surprisingly result was the finding of a positive relationship between the eosinophils and the IgG values against *F. hepatica* in people living in the town. Rondelaud *et al.*, (2000) proved that the seroprevalence

C. Díez Morrondo et al.

of fasciolosis increased in the urban people in France due to the migratory movements of young population from the country to the town.

We concluded that there is an association between the rural environment and the sensitization against the antigens of *T. canis*, *A. suum* and *F. hepatica*. Study data suggest that women living in rural regions are at increased risk for developing IgG antibodies against *A. suum*. Comprehensive understanding of this helminth-sensitization may lead to better pet and farm management practices, based on health education to the establishment of pathogen reduction programs. Further studies are in design to consider the interest for employing other antigens belonging to parasite helminthes, as *Trichinella*.

REFERENCES

1. ALLENDE A, SELMA MV, LÓPEZ-GÁLVEZ F, VILLAESCUSA R, GIL MI. 2008. Impact of wash water quality on sensory and microbial quality, including *Escherichia coli* cross-contamination, of fresh-cut escarole. *J Food Prot* 71: 2514-2518.
2. CHAUDHRY R, PANDEY A, DAS A, BROOR S. 2009. Infection potpourri: are we watching? *Indian J Pathol Microbiol* 52: 125.
3. DESPOMMIER D. 2003. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clin Microbiol Rev* 16: 265-272.
4. FERREIRA UM, RUBINSKY-ELEFANT G, DE CASTRO TG, HOFFMANN EH, DA SILVA-NUNES M, CARDOSO MA, MUNIZ PT. 2007. Bottle feeding and exposure to *Toxocara* as risk factors for wheezing illness among under-five Amazonian children: a population-based cross-sectional study. *J Trop Pediatr* 53: 119-124.
5. GRAY GC, MCCARTHY T, CAPUANO AW, SETTERQUIST SF, OLSEN CW, ALAVANJA MC. 2007. Swine workers and swine influenza virus infections. *Emerg Infect Dis* 13: 1871-1878.
6. IBASETA P. 2009. Relación entre la artritis reumatoide y la presencia de anticuerpos frente a helmintos parásitos responsables de zoonosis. Trabajo de Investigación Tutelado, Universidad de Santiago de Compostela: 1-36.
7. LJUNGSTRÖM I, VAN KNAPEN F. 1989. An epidemiological and serological study of *Toxocara* infection in Sweden. *Scand J Infect Dis* 21: 87-93.
8. MACPHERSON CN. 2005. Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses. *Int J Parasitol* 35: 1319-1331.
9. MARCOS L, MAÇO V, SAMALVIDES F, TERASHIMA A, ESPINOZA JR, GOTUZZO E. 2006. Risk factors for *Fasciola hepatica* infection in children: a case-control study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100: 158-166.
10. MARTENS W, BÖHM R. 2009. Overview of the ability of different treatment methods for liquid and solid manure to inactivate pathogens. *Bioresour Technol* 100: 5374-5378.
11. O'NEILL SM, PARKINSON M, DOWDAJ, STRAUSS W, ANGLES R, DALTON JP. 1999. Immunodiagnosis of human fascioliasis using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L1 cysteine proteinase. *Am J Trop Med Hyg* 60: 749-751.
12. PAZ-SILVA A, SÁNCHEZ-ANDRADE R, SUÁREZ JL, PEDREIRA J, ARIAS M, LÓPEZ C, PANADERO R, DÍAZ P, DÍEZ-BAÑOS P, MORRONGO P. 2003. Prevalence of natural ovine fasciolosis shown by demonstrating the presence of serum circulating antigens. *Parasitol Res* 91: 328-331.
13. ROMASANTA A, ROMERO JL, ARIAS M, SÁNCHEZ-ANDRADE R, LÓPEZ C, SUÁREZ JL, DÍAZ P, DÍEZ-BAÑOS P, MORRONGO P, PAZ-SILVA A. 2003. Diagnosis of parasitic zoonoses by immunoenzymatic assays. Analysis of cross-reactivity among the excretory/secretory antigens of *Fasciola hepatica*, *Toxocara canis*, and *Ascaris suum*. *Immunol Invest* 32: 131-142.
14. RONDELAUD D, DREYFUSS G, BOUTEILLE B, DARDÉ ML. 2000. Changes in human fasciolosis in a temperate area: about some observations over a 28-year period in central France. *Parasitol Res* 86: 753-757.
15. SÁNCHEZ-ANDRADE A, SUÁREZ JL, ARIAS M, FRANCISCO I, DÍEZ C, CORTIÑAS J, ROMASANTA A, MORRONGO P, DÍEZ-BAÑOS P, PAZ-SILVA A, SÁNCHEZ-ANDRADE R. 2008. Relationships between eosinophilia, anti-*Fasciola* IgG, and IgM rheumatoid factors, in urban and rural areas of north-western Spain. *Ann Trop Med Parasitol* 102: 489-498.
16. SÁNCHEZ-ANDRADE R, PAZ-SILVA A, SUÁREZ JL, PANADERO R, DÍEZ-BAÑOS P, MORRONGO P. 2000. Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). *Vet Parasitol* 93: 39-46.
17. THURSFIELD M. 2005. *Veterinary Epidemiology*, 3rd ed. Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, USA.
18. UGBOMOIKO US, ARIZA L, HEUKELBACH J. 2008. Parasites of importance for human health in Nigerian dogs: high prevalence and limited knowledge of pet owners. *BMC Vet Res* 4: 49.
19. WOSSENE A, TSUJI N, KASUGA-AOKI H, MIYOSHI T, ISOBE T, ARAKAWA T, MATSUMOTO Y, YOSHIHARA S. 2002. Lung-stage protein profile and antigenic relationship between *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum*. *J Parasitol* 88: 826-828.
20. WYNN TA. 1997. The debate over the effector function of eosinophils in helminth infection: new evidence from studies on the regulation of vaccine immunity by IL-12. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 105-108.
21. ZWOLIŃSKI J. 2000. The risk factors of *Toxocara canis* infestation in population of patients from the Lublin region. *Wiad Parazytol* 46: 463-473.

Acknowledgements: This work was partly supported by the Project XUGA PGIDIT06BTF26101PR (Consellería de Innovación e Industria, Xunta de Galicia, Spain). We are in debt with Mrs. B. Valcárcel for critically reading the manuscript.

SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; SÁNCHEZ-ANDRADE, A.; SUÁREZ, J.L.; ARIAS, M.; FRANCISCO, I.; DÍEZ, C.; ROMASANTA, A.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P.; PAZ-SILVA, A. (2009). Relationship among presence of antibodies against *Ascaris suum*, eosinophilia and autoantibodies (IgM-RF). **The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, 7: 57-62.

Relationship among presence of antibodies against *ascaris suum*, eosinophilia and autoantibodies (igm-rf)

R. Sánchez-Andrade²
A. Sánchez-Andrade²
J.L Suárez,
M. Arias¹
I. Francisco¹
C. Díez³
A. Romasanta¹
P. Morondo¹
P. Díez-Baños¹
A. Paz-Silva.¹

¹Department of Animal Pathology, Zoonoses, Epidemiology and Parasitic diseases,
College of Veterinary Medicine,
University of Santiago de Compostela,
27001-Lugo (Spain)

³Rheumatological Diseases Department
Hospital Xeral
(Lugo, Spain).

³Rheumatological Diseases Department
Hospital Juan Canalejo
(A Coruña, Spain)

KEY WORDS: IgM-RF, habitat, gender, ascariasis seroprevalence, eosinophilia

ABSTRACT

The possible association among the presence of IgG antibodies against the parasitic helminth *Ascaris suum*, eosinophilia, and that of IgM-rheumatoid factors (IgM-RF) was analyzed in blood samples from 1264 persons. Three groups according to the values of eosinophils were considered, normal (G-C, <0.5 10⁹ l⁻¹), eosinophilic (G-I, 0.5-3 10⁹ l⁻¹) and hypereosinophilic (G-II, >3 10⁹ l⁻¹). The detection of IgG antibodies was done by using a modified enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with *A. suum*

excretory/secretory antigens, and IgM-RF autoantibodies by a latex agglutination test. Forty-one percent of the cases were positive to ascariasis and 15% had IgM-RF autoantibodies. The greatest values were reached in women from rural areas. The highest percentages of eosinophilic patients were found in men from rural areas. A positive and significant association between eosinophilia and IgM-RF autoantibodies was observed. We concluded that people living in rural regions have a higher risk for developing IgG antibodies against *A. suum*.

INTRODUCTION

Diagnosis of several helminthzoonosis like

Table 1.- Distribution of the blood samples analyzed in the current investigation by considering the sex and the place where the patients are living (n= 1264).

	Male		Female		Total	
	Urban	Rural	Urban	Rural	Urban	Rural
W. group	41	54	112	272	153	326
M. I.	71	71	54	136	125	207
Total	112	125	166	408	278	633

toxocariosis, trichinellosis or anisakiosis in human population toxocariosis is difficult because neither worms nor eggs are eliminated in faeces. Presumption of some human parasitic diseases is based on the presence of hypereosinophilia, and peripheral blood eosinophilia has been widely associated with helminthiasis responsible for visceral larva migrans¹, although this increase is non-specific and can be attributable to other diseases.

The finding that migrating larvae release excretory/secretory antigens in the host which stimulate the production of antibodies was employed to develop diagnostic probes focused on the detection of the humoral immune response against parasite antigens, such as the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test².

The antibodies produced by the immune system do not attach to foreign substances only, and antibodies which binds other immunoglobulins are also released, the autoantibodies. Rheumatoid factors (RFs) are Fc-specific anti-IgG autoantibodies, usually of IgM isotype. Low titers of RFs are often detected in normal individuals, but RF high levels are detectable in up to 10% of normal individuals, 70-80% patients with several inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis and in other systemic infections. RFs are used in clinical practice to diagnose some inflamma-

tory disorders³.

The main goal in this investigation was to elucidate the possible relationship among the presence of antibodies against *Ascaris suum*, eosinophilia and the production of IgM-RF autoantibodies.

MATERIALS AND METHODS

Sera collection

Sera from 1264 adult individuals were randomly collected from the Hospital Xeral (Lugo, Spain). No parasitological signs or rheumatologic diseases had been previously detected. Coprological tests were negative. Table I reflects the distribution of the samples according to their sex and habitat. Three groups were considered by taking account the values of eosinophils: normal, G-C (<0.5 10⁹ l⁻¹), eosinophilic, G-I (0.5-3 10⁹ l⁻¹) and hypereosinophilic G-II (>3 10⁹ l⁻¹).

IgM-RF detection

This test was carried out with the RF latex kit (Monlab, Barcelona, Spain). Macroscopic agglutination of IgG coated latex particles indicated a positive reaction. Quantification of positive results was not done. Positive and negative controls provided in the kit were included.

Excretory/secretory antigen preparation

Table 2 Risk analysis of the prevalence of antibodies against *Ascaris suum*, IgM-RF and eosinophilia.

		Women (n= 752)	Men (n= 512)	Country (n= 754)	Urban (n= 514)
Antibodies to <i>A. suum</i>					
Total cases: 621	n	215	206	215	401
	OR (95% CI)	1.8 (0.8-3.6)	0.5 (0.4-0.7)	1.7 (1.2-2.1)	0.6 (0.2-0.8)
	χ^2		18.947		14.107
	P		0.001		0.001
RF-IgM					
Total cases: 190	n	138	52	138	52
	OR (95% CI)	1.9	0.5	1.25	0.8
	χ^2		9.241		1.342
	P		0.002		0.247
Eosinophilia					
Total cases: 1073	n	616	457	613	460
	OR (95% CI)	0.5	1.8	1.2	0.85
	χ^2		14.045		0.787
	P		0.001		0.675

Table 3 Average values of IgG optical densities and eosinophil counts.

		IgG OD (492 nm) Cut-off:		Eosinophil counts ($\times 10^9$ l^{-1})	
		$\bar{x} \pm SD$	F P	$\bar{x} \pm SD$	F P
Patients' sex	Women	0.8678 \pm 0.3826	27.324	0.8977 \pm 0.5886	6.591
	Men	0.7340 \pm 0.3599	0.001	1.003 \pm 0.6176	0.010
Habitat	Urban	0.7205 \pm 0.3074	39.393	0.9363 \pm 0.6169	0.061
	Country	0.8795 \pm 0.4102	0.003	0.9464 \pm 0.5821	0.805
Antibodies to <i>A. suum</i>	Negative	0.5347 \pm 0.1474	1132.7	0.9592 \pm 0.6222	3.160
	Positive	1.1029 \pm 0.3252	0.001	0.8713 \pm 0.5180	0.076
FR-IgM detection	Negative	0.8295 \pm 0.3919	8.894	0.93 \pm 0.5243	1.528
	Positive	0.7242 \pm 0.2817	0.003	1 \pm 0.9281	0.217

The use of excretory/secretory antigens from *A. suum* (AsES) was based on prior reports⁴. Adult worms were collected from swine guts at the slaughterhouse and washed several times in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.5). Females were identified and dissected under stereomicroscope, and *A. suum*-eggs collected from their uteri. After mechanical disruption of the eggs for obtaining the L2, the larvae were finally incubated in RPMI medium at 37°C and 5% CO₂ atmosphere for 6 hours. Eggs were removed by sieving and centrifugation, and the supernatant containing AsES products was collected and lyophilised. The protein concentration was estimated by the BCA technique described by Pierce®.

Detection of IgG against AsES

The antibody levels against the parasitic antigens were established by means of an indirect-ELISA. Wells of micro-plates were coated with 100 μ l antigen (1 μ g ml⁻¹) and incubated overnight at 4°C. Blocking of excess-binding sites was performed by incubation with 250 μ l of PBS containing 0.05% Tween and 1% skimmed milk (PTM) for 30 min at 37°C. Human sera diluted 1/50 in PTM were added in duplicate to the wells and incubated for 1 h at 37 °C. After 6 washings 100 μ l of horseradish-

peroxidase-conjugated (HRP-conjugated) sheep anti-human IgG (H&L chains, Nordic Immunology Laboratories, Tilburg, Netherlands Nordic Immunology) were added diluted 1/1000 in PTM and incubated for 1 h at 37°C. 100 μ l of substrate consisting of 10 mg of ortho-phenylenediamine in 12 ml citrate buffer (pH 5.0) and 10 μ l of 30% H₂O₂ were added to each well. The plates were incubated in the dark for 15 min at room temperature. The colour reaction was stopped by addition of 100 μ l of 3N H₂SO₄, and absorbances were read using a spectrophotometer (Titertek Multiskan) at 492 nm.

In order to establish the cut-off point, positive values were the mean optical density (OD) of all negative sera plus three standard deviations⁵. Mean OD negative sera values were 0.3810 with a standard deviation of 0.0371. Thus, positive absorbance values were 0.4923 or higher.

Statistical methods

Statistical analysis was conducted using ANOVA (significance limit at $p=0.05$). The non-parametric Spearman's correlation test was applied to evaluate the existence of correlation among the different variables considered. All tests were performed by the statistical package SPSS, version 14 (SPSS Inc., 2006).

RESULTS

ELISA

Forty-nine percent (95% CI, 46-52) individuals had positive IgG antibodies against AsES (Table II). A significant greater seroprevalence was observed in women (55%, 50-60) than in men (40%, 36-44) ($\chi^2 = 18.947$, $p = 0.001$). The odds ratio (OR) value for the women was 1.8.

The seroprevalence was higher in the people living in rural areas (54%, 50-58) than those in the city (42%, 38-46). These differences were significant ($\chi^2 = 14.303$, $p = 0.001$) and the OR was 1.7 for the country people (Table II).

As drawn in Table III, the values of absorbance were significantly greater in women than in men ($F = 27.324$, $p = 0.001$). ANOVA showed statistical differences in the absorbances between countryside patients and those from the city ($F = 39.393$, $p = 0.003$).

IgM-RF

The presence of IgM-RF was found in 15% (13-17) of the sera analyzed (Table II). The percentage of positive cases was higher in women (18%, 15-21) than in men (11%, 8-14) and these differences were significant ($\chi^2 = 9.241$, $p = 0.002$). A significant OR value of 1.9 was estimated for the women.

The percentage of IgM-RF positive cases was similar in country (16%, 13-19) and urban individuals (14%, 11-17) and statistical differences were not obtained (Table II).

We observed 38% (73/190) of the patients with IgM-RF had also IgG against AsES. The value for OR of in these patients was 0.6 (0.4-0.8) ($\chi^2 = 7.238$, $p = 0.007$).

Table 4 Analysis of the relation among the presence of IgG against *Ascaris suum* excretory/secretory antigens, eosinophilia and IgM-RF.

	Antibodies to <i>A. suum</i>			IgM-RF		
	OR (95% CI)	χ^2	p	OR (95% CI)	χ^2	p
Eosinophilia	0.4 (0.2-0.5)	28.266	0.001	2 (1.5-2.7)	6.022	0.049
IgM-RF	0.6 (0.4-0.8)	6.738	0.009			

Eosinophilia

Eighty-five percent (82-89) of the samples analyzed presented eosinophilia. From these cases, 69% (66-72) belonged to G-I and 31% (28-34) to G-II (Table I).

The highest percentages of eosinophilia were found in men (89%, 86-92), and statistical differences with the sex of the patients were observed ($\chi^2 = 14.045$, $p = 0.001$) (Table II). An OR value of 1.9 was assessed for the masculine cases.

People living in the countryside achieved a greater prevalence (86%, 84-88) than those in the town (84%) (Table II), and by means of the Chi-square test significant differences were not proved ($p > 0.05$).

Eosinophilia and IgG antibodies to AsES was obtained in 45% patients (41-49), but 70% (64-76) cases with normal values of eosinophils were also positive to ascariasis ($\chi^2 = 28.014$, $p = 0.001$). By using the Spearman's test, a negative and significant correlation between the levels of eosinophils and IgG was established ($r = -0.186$, $p = 0.001$).

The percentage of cases with eosinophilia was greater in the IgM-RF positive patients (91%), and by estimating the OR value a significant relationship between these parameters was achieved (OR = 2, 1-3.6; $\chi^2 = 4.583$, $p = 0.032$).

Table III reflects that the eosinophil counts were significantly greater in men than in women. No differences were recorded in the eosinophil values regarding the habitat of the individuals or that of IgM-RF.

The relation among the eosinophilia, seroprevalence of antibodies against *A. suum*

and IgM-RF is represented in Table IV. A positive significant relation between IgM-RF and eosinophilia was found ($OR = 3.1$; $\chi^2 = 34.952$, $p = 0.001$).

DISCUSSION

Eosinophilia may be attributable to several pathologies, including allergy, parasitic infections, neoplasms, vasculitis and some autoimmune diseases. For this reason, a case-study to gain more information on the influence of some factors in the eosinophilia, like the presence of IgG antibodies to the nematode *A. suum* or IgM-RF was conducted.

In the current work, we found 45% of patients with eosinophilia had positive IgG values against *A. suum*, but this percentage was 70% in the normal patients, which indicates the absence of relation between these two parameters. It is also remarkable that a negative and a significant correlation between the eosinophilia and the antibodies was obtained.

The percentage of patients positive both to eosinophilia and to autoantibodies was 91%, and a significant risk for eosinophilia in positive IgM-RF cases was established. In previous works eosinophil counts were significantly higher in the positive RF level group than those in a negative one⁶.

The presence of eosinophilia was significantly enhanced in men and the estimation of OR showed this population had a greater risk for eosinophilia, opposite to that reported in preceding investigations⁷.

The risk for ascariasis was higher in patients from rural areas which could be attributable to the pig farming conditions in the area of study. In most of rural farms from NW Spain, 1-4 pigs are maintained per year for family consumption. Treatment against parasites is seldom administered to swine livestock, and manure is manually eliminated. By following ancient traditions, pig guts are washed in water-courses for the elaboration of sausages. This implies that the possibility for sensitization with *A. suum* antigens is elevated in the population of this area. In people from Denmark all the ex-

amined patients acquired *Ascaris*-infections from domestic pigs, and ascariasis might therefore be considered a zoonotic disease⁸.

A significant risk for RF was found in women living in rural areas. There is a lack of information concerning the presence of autoantibodies. Although a relationship has been suggested between rheumatoid arthritis and contact with animals and soil, to date this has not been evident⁹.

Different mechanisms have been proposed to explain the production of autoantibodies, such as polyclonal B cell activation and molecular mimicry. Infection with helminth parasites induces a humoral immune response due to the activation of B cells¹⁰. It is tempting to speculate that the persistence of immune complexes, caused by inefficient clearance or by local production, may result in sustained T cell help to RF B cells. It is also noticeable the finding that the RFs may be present more than 10 years before the onset of clinical disease¹¹, which suggests that important environmental factors are acting years before disease onset.

We concluded there is an association between eosinophilia and IgM-RF autoantibodies. People living in rural regions have a higher risk for developing IgG antibodies against *A. suum*. Further investigation is in progress to gain more knowledge about the influence of the residence place and the patients' gender on the presence of antibodies and autoantibodies.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was partly supported by the Project XUGA PGIDIT06BTF26101PR (Consellería de Innovación e Industria, Xunta de Galicia, Spain). We are in debt with Mrs. B. Valcárcel for critically reading the manuscript.

REFERENCES

- 1.- Magnaval JF, Fabre R, Maurieres P, et al: Evaluation of an immunoenzymatic assay detecting specific anti-Toxocara immunoglobulin E for diagnosis and posttreatment follow-up of human toxocariasis. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2269-2274.
- 2.- Humbert P, Buchet S, Barde T, et al: Toxocariasis. A cosmopolitan parasitic zoonosis. *Allerg Immunol* (Paris)

- 1995; 27: 284-291.
- 3.- Goldbach-Mansky R, Lee J, McCoy A, et al: Rheumatoid arthritis associated autoantibodies in patients with synovitis of recent onset. *Arthritis Res* 2000; 2: 236-243.
- 4.- Romasanta A, Romero, JL, Arias M, et al: Diagnosis of parasitic zoonoses by immunoenzymatic assays. Analysis of cross-reactivity among the excretory/secretory antigens of *Fasciola hepatica*, *Toxocara canis*, and *Ascaris suum*. *Immunol Invest* 2003; 32: 131-142.
- 5.- Hillyer GV, Soler de Galanes M, Rodríguez-Pérez J, et al: Use of the Falcon assay screening test--enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) and the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) to determine the prevalence of human fascioliasis in the Bolivian Altiplano. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 46: 603-609.
- 6.- Kobayashi M, Yasui N, Ishimaru N, et al: Development of autoimmune arthritis with aging via bystander T cell activation in the mouse model of Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3974-3984.
- 7.- Hanvivatvong O, Tirawatnapong S, Kaowopas Y, et al: Prevalence of autoantibodies in Thai elderly. *J Med Assoc Thai* 2003; 86: 242-249.
- 8.- Nejsum P, Parker ED Jr, Frydenberg J, et al: Ascariasis is a zoonosis in Denmark. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1142-1148.
- 9.- Kaplan M, Kamanli A, Kalkan A, et al: Toxocariasis seroprevalence in patients with rheumatoid arthritis. *Turk Paraz Derg* 2005; 29: 251-254.
- 10.- Wynn TA: The debate over the effector function of eosinophils in helminth infection: new evidence from studies on the regulation of vaccine immunity by IL-12. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; 92: 105-108.
- 11.- Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, et al: Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 380-386.

A. SÁNCHEZ-ANDRADE, J.L. SUÁREZ, M. ARIAS, I. FRANCISCO, C. DÍEZ, J. CORTIÑAS, A. ROMASANTA, P. MORRONGO, P. DÍEZ-BAÑOS, A. PAZ-SILVA, R. SÁNCHEZ-ANDRADE. (2010). Relationships between eosinophilia, anti-*Fasciola* IgG, and IgM rheumatoid factors, in urban and rural areas of north-western Spain. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, 102: 489-498.

Relationships between eosinophilia, anti-*Fasciola* IgG, and IgM rheumatoid factors, in urban and rural areas of north-western Spain

A. SÁNCHEZ-ANDRADE*, J. L. SUÁREZ†, M. ARIAS†, I. FRANCISCO†, C. DíEZ‡, J. CORTIÑAS†, A. ROMASANTA†, P. MORRONGO†, P. DíEZ-BAÑOS†, A. PAZ-SILVA† and R. SÁNCHEZ-ANDRADE†

*Rheumatology Department, Hospital Xeral-Calde, Dr Ochoa, s/n, 27004 – Lugo, Spain

†Animal Pathology, Epidemiology, Zoonoses and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Santiago de Compostela, Campus Universitario, s/n, 270002 – Lugo, Spain

‡Rheumatology Department, Hospital Juan Canalejo, Xubias de Arriba, 84, 15006 – A Coruña, Spain

Received 14 September 2007, Revised 29 February 2008,

Accepted 10 March 2008

A study was carried out, among adult patients attending a hospital in Lugo, in north-western Spain, to investigate possible relationships between eosinophilia, IgG antibodies against the parasitic helminth *Fasciola hepatica*, and IgM rheumatoid factors (IgM-RF). Blood samples were collected from 1264 individuals and divided into three groups according to eosinophil count: normal ($<0.5 \times 10^9$ eosinophils/litre), eosinophilic (0.5×10^9 – 3×10^9 /litre) or hyper-eosinophilic ($>3 \times 10^9$ /litre). Each sample was checked for IgG against *F. hepatica*, in an ELISA in which the excretory/secretory products of the trematode were used as the antigens, and for IgM-RF, in a latex agglutination test. Overall, 21% of the cases were found seropositive for fascioliasis and 15% were found to have IgM-RF. Women from rural areas not only showed the highest seroprevalence of fascioliasis but also the highest frequency of IgM-RF carriage. Men from rural areas were more likely to be eosinophilic than the other patients. Curiously, the patients found seronegative for fascioliasis were more likely (but not significantly more likely) to be eosinophilic than their seropositive counterparts, and the eosinophilic patients were significantly more likely ($P=0.001$) to be carrying IgM-RF auto-antibodies than the non-eosinophilic. It appears that, in the study area, those living in rural regions have a higher risk of *F. hepatica* infection (as indicated by IgG antibodies against the parasite) than those living in urban settings. The risk of developing eosinophilia appears to be positively associated with the presence of IgM-RF auto-antibodies.

In humans, the diagnosis of many helminth infections is complicated by the non-specificity of the symptoms (often fever, myalgia, abdominal pain and/or diarrhoea) and signs (high eosinophil counts and increased enzyme levels, for example, are common to several parasitoses). Asymptomatic human infection may be common and go totally undetected, unless antigen- or antibody-detection tests or molecular assays for the detection of

parasite-specific DNA are employed. As many human infections with *Fasciola hepatica*, for example, are asymptomatic, at least for long periods, the true extent of the public-health problem posed by this parasite can often only be accurately assessed in cross-sectional surveys based on serology (Hillyer and Apt, 1997). Human fascioliasis, a wide-spread zoonosis that is considered to be an emerging disease in many countries (O'Neill *et al.*, 1999), is acquired by the ingestion of the metacercariae of *F. hepatica*, usually on salad leaves or other raw vegetables. Sheep and

Reprint requests to: A. Paz-Silva.

E-mail: adolpaz@lugo.usc.es; fax: +34 982 252195.

© 2008 The Liverpool School of Tropical Medicine

DOI: 10.1179/136485908X311777

cattle are the usual definitive hosts of this trematode, in areas where the temperature and humidity favour the development of *Galba truncatula* or other intermediate host snails. In such livestock, the parasite can cause significant morbidity and economic losses.

Inflammatory diseases pose a significant burden in any community, not only in terms of losses in the duration and quality of life but also in the associated, direct and indirect, financial costs (Morand, 2005). Rheumatoid factors (RF) are Fc-specific anti-IgG auto-antibodies, usually of IgM isotype. Many apparently normal individuals have low serum titres of RF but up to 10% of such individuals and 70%–80% of those with some inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis and some systemic infections, have relatively high titres (Tighe and Carson, 2001). Rheumatoid factors are important as severity markers in rheumatoid arthritis, and are used, in clinical practice, in the diagnosis of this and some other inflammatory disorders (Goldbach-Mansky *et al.*, 2000). There also appear to be links between the presence of RF and serum levels of some sex hormones (Masi *et al.*, 2006), tobacco use (Costenbader *et al.*, 2006) and Sjögren's syndrome (Sznato *et al.*, 2005).

The main objective of the present study was investigate the relationships, if any, between eosinophilia, the presence of IgG antibodies against *F. hepatica*, and the presence of RF of IgM subtype (IgM-RF) in patients attending a hospital in a cattle-breeding region with oceanic climate, in

north-western Spain. A latex agglutination test (LAT) was used to detect the IgM-RF whereas an ELISA based on *F. hepatica* excretory/secretory antigens was used to detect anti-*Fasciola* IgG. The results were analysed according the gender of each subject and whether the subject's place of residence was urban or rural.

SUBJECTS AND METHODS

Sera and Eosinophil Counts

The sera investigated came from 1264 adults attending the Hospital Xeral, in Lugo, in north-western Spain (Table 1). Each sample had been collected, with the donor's consent, for routine haematology. None of the donors had any symptoms indicative of a parasitic or rheumatological disease. Stool samples collected from the donors (one/patient) were all found negative for helminth eggs. A thin smear of blood from each patient was fixed in methanol and Giemsa-stained so that the number of eosinophils/100 leucocytes could be determined. The percentage of leucocytes represented by eosinophils was then multiplied by the total leucocyte count (determined in a haemocytometer) to give the absolute eosinophil count (as eosinophils/litre). Patients found to have $<0.5 \times 10^9$, 0.5×10^9 – 3×10^9 and $>3 \times 10^9$ eosinophils/litre were considered normal, eosinophilic, and hyper-eosinophilic, respectively.

TABLE 1. The genders, levels of eosinophilia and residential settings of the 1264 adult patients who provided the test sera

Gender	No. of patients with:								
	Normal eosinophil counts			Eosinophilia*			Hyper-eosinophilia		
	Rural	Urban	All	Rural	Urban	All	Rural	Urban	All
Female	83	54	137	272	171	443	109	63	172
Male	23	31	54	169	129	298	86	74	160
Both	106	85	191	441	300	741	195	137	332

*Excluding those with hyper-eosinophilia.

IgM-RF Detection

Each serum sample was tested for IgM-RF using a commercial latex-agglutination kit (Monlab, Barcelona, Spain). The macroscopic agglutination of the IgG-coated latex particles supplied in the kit indicated a positive reaction. Although the positive and negative controls provided in the kit were included in each test run, no attempt was made to quantify the level of agglutination seen with each positive serum.

ELISA for the Detection of Anti-*Fasciola* IgG

ANTIGEN PREPARATION

The excretory/secretory antigens of *F. hepatica* have already been successfully used in ELISA for the serological detection of infection with the trematode (Romasanta *et al.*, 2003). For the present study, such antigens were prepared using adult flukes collected from the bile ducts of cattle killed in a slaughterhouse in Lugo. These flukes were washed several times in phosphate-buffered saline at pH 7.5 (PBS,) before incubation in RPMI medium, at 37°C and in an atmosphere containing 5% CO₂, for 6 h. The flukes and any eggs were removed by sieving and centrifugation, and the supernatant solution, which contained the excretory/secretory antigens, was collected and lyophilised. For use in the ELISA, the antigen extract was resuspended in distilled water to give 2 µg protein/ml (the protein concentration being estimated in a commercial bicinchoninic-acid assay; Pierce Chemical, Rockford, IL).

ASSAY PROTOCOL

The excretory/secretory antigens were used, in an indirect ELISA, to evaluate the titres of anti-*Fasciola* IgG in each serum. For this assay, the wells of a microtitre plates were each coated with 100 µl of the antigen preparation and incubated overnight at 4°C. After blocking, for 30 min at 37°C, with PBS containing 0.05% Tween and 1% skimmed milk (PTM; 250 µl/well), the test

sera, diluted 1:100 in PTM, were incubated in the wells for 1 h at 37°C. After six washes in PBS, 100 µl of a 1:1000 dilution of horseradish-peroxidase-conjugated sheep anti-human IgG (heavy and light chains; Nordic Immunology Laboratories, Tilburg, Netherlands) in PTM were added to each well and incubated for 1 h at 37°C. Then 100 µl of a substrate mixture, consisting of 10 mg *ortho*-phenylenediamine in 12 ml citrate buffer (pH 5.0) and 10 µl 30% H₂O₂, were added to each well. After 15 min in the dark, at room temperature, the colour reactions were stopped by the addition of 100 µl 1.5 M H₂SO₄ to each well, and then the optical densities (OD) of the well contents were read in a Multiskan spectrophotometer (Titertek Instruments, Huntsville, AL), at 492 nm.

In addition to the 1264 test sera, 63 negative-control sera, from residents of Lugo whose stools had been found egg-negative when checked repeatedly over the 6 months prior to the serum collection, were also tested. A test serum was considered positive for anti-*Fasciola* IgG if it gave an OD that exceeded the mean value for these negative-control sera plus three S.D. (Hillyer *et al.*, 1992). As the mean OD for the negative controls was 0.2730, with an S.D. of 0.0138, any test sera giving an OD of ≥ 0.3144 were deemed positive.

Twelve of the negative-control sera and 10 positive-control sera (from residents of Lugo whose stools had been found egg-positive for *Fasciola* shortly before their sera were collected) were checked in the ELISA (to check the sensitivity of the assay) and also in a similar assay based on the excretory/secretory antigens of Spanish *Toxocara canis* (to see if anti-*Fasciola* IgG might react with the *Toxocara* antigens).

Statistical Methods

Version 14 of the SPSS software package (SPSS Inc., Chicago, IL) was used to conduct analyses of variance (with the calculation of *F*-values), χ^2 tests, and non-parametric

Spearman's correlation tests, and to calculate crude odds ratios (OR), as appropriate. A *P*-value of 0.05 or less was considered indicative of a statistically significant difference.

RESULTS

Fascioliasis

Overall, 270 (21%) of the 1264 test sera were found positive for anti-*Fasciola* IgG (Table 2). The seroprevalence of *Fasciola* infection was significantly higher in the women investigated than in the men (25% *v.* 16%; *P*=0.002), with an OR of 1.7 for the women. It was also significantly higher in the subjects who lived in rural areas than in those who lived in urban Lugo (25% *v.* 16%; *P*=0.002), with an OR of 1.8 for the rural subjects. In general, in the *Fasciola* ELISA (Table 3), the women investigated gave higher OD than the men (*F*=7.125; *P*=0.008) and the rural subjects gave higher OD than the subjects who lived in urban settings (*F*=8.691; *P*=0.003).

Of the positive-control sera from individuals known to have fascioliasis, only one appeared seropositive in the ELISA based on the excretory/secretory antigens of *T. canis* whereas all appeared seropositive in the *Fasciola* ELISA. None of the negative-control sera gave a positive result either in the *Toxocara* assay or the *Fasciola* assay.

IgM-RF

Of the 1264 test sera investigated (Table 2), IgM-RF was found in 190 (15%). The women investigated were more likely to be carrying IgM-RF than the men (18% *v.* 11%; *P*=0.002), with an OR of 1.9 for the women. Overall, 16% of the rural subjects and 14% of the urban subjects were found positive for IgM-RF (*P*=0.247; Table 2).

Eosinophilia

Of the subjects who provided the test sera, 1073 (85%) were found to have eosinophilia

and 332 (31%) of these eosinophilic subjects were considered to be hyper-eosinophilic (Table 1). Although the men investigated were significantly more likely to be eosinophilic than the women (89.3% *v.* 81.9%; *P*=0.001; Table 2), with an OR of 1.9 for the men, the frequency of eosinophilia among the rural subjects was similar to that among the urbanites (86% *v.* 84%; *P*=0.675; Table 2).

The men investigated had a significantly higher mean eosinophil count than the women (*P*=0.010) but the urban subjects had very similar counts to the rural subjects (*P*=0.805; Table 3).

Inter-relationships

Compared with a subject without IgM-RF, a subject with IgM-RF was more than three times as likely (OR=3.1) to be found seropositive for *Fasciola* infection ($\chi^2=34.952$; *P*=0.001). The OD recorded in the *Fasciola* ELISA were, in general, significantly higher for those found to have IgM-RF than those not found to have these factors (Table 3 and Figure 1). The prevalence of eosinophilia was higher in the subjects who were seronegative for *Fasciola* infection than in the seropositive subjects but the difference was not statistically significant (86% *v.* 81%; *P*>0.05). Similarly, the mean eosinophil count for those seropositive for *Fasciola* infection was similar to that of the seronegative subjects (Table 3 and Figure 2). The negative correlation seen between eosinophil counts and the OD recorded in the *Fasciola* ELISA (Fig. 3) was, however, statistically significant (*r*=-0.109; *P*=0.001).

Compared with a subject found negative for the factors, a subject found positive for IgM-RF was twice as likely to be eosinophilic (OR=2; $\chi^2=6.022$; *P*=0.049). The mean eosinophil count for those carrying the factors was significantly higher than the corresponding count for the other subjects (Table 3 and Figure 4).

TABLE 2. The percentages of the women, men, rural residents and urban residents found positive for anti-Fasciola IgG, rheumatoid factors of IgM subtype (IgM-RF) and/or eosinophilia

Characteristic	No. of subjects investigated	Anti-Fasciola IgG				IgM-RF				Eosinophilia			
		No. and (%) of subjects found positive	Odds ratio	χ^2	P	No. and (%) of subjects found positive	Odds ratio	χ^2	P	No. and (%) of subjects found positive	Odds ratio	χ^2	P
GENDER													
Female	752	188 (25)	1.7	9.221	0.002	135 (18)	1.9	9.241	0.002	616 (82)	0.5	14.045	0.001
Male	512	82 (16)	0.6			55 (11)	0.5			457 (89)	1.9		
Both	1264	270 (21)				190 (15)				1073 (85)			
RESIDENTIAL SETTING													
Rural	740	185 (25)	1.8	10.958	0.001	118 (16)	1.3	1.342	0.247	633 (86)	1.2	0.787	0.675
Urban	524	85 (16)	0.6			72 (14)	0.8			440 (84)	0.9		
Both	1264	270 (21)				190 (15)				1073 (85)			

DISCUSSION

Eosinophilia may be attributable to several pathologies, including allergy, parasitic infection, neoplasm, vasculitis and some autoimmune diseases (Wardlaw and Kay, 1987). One aim of the present study, which was based in a livestock-rearing area of northern Spain, was to see if eosinophilia was a useful indicator of fascioliasis and whether its usefulness was reduced by the presence in the blood of rheumatoid factors linked to rheumatoid arthritis or other illness.

Although human infections with *F. hepatica* may be detected by the examination of stool samples, with or without concentration by centrifugation or sedimentation, the excreted eggs of the parasite may be difficult to detect and be present in the faeces only in low numbers. Several helminth zoonoses are the cause of eosinophilia in the peripheral blood and may also provoke eosinophilia infiltration in the internal organs (Kwon *et al.*, 2006). Although eosinophilia in a patient may lead the attending clinician to suspect fascioliasis, it is found in many other parasitoses. If no *Fasciola* eggs can be found in the faeces, a suspected case of fascioliasis, even one with marked eosinophilia, should

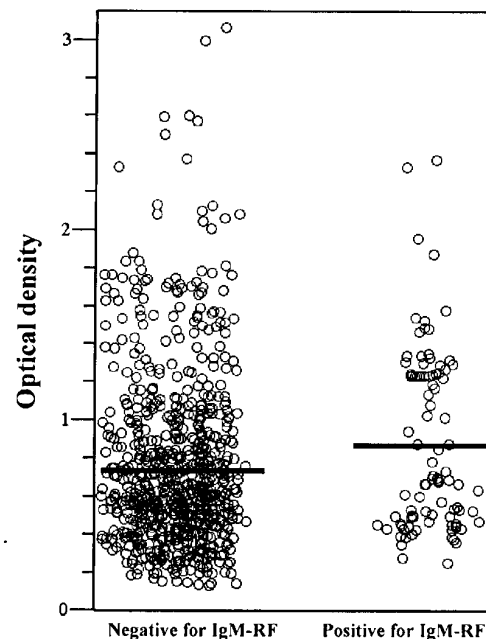


FIG. 1. The optical densities recorded, in the ELISA for the detection of anti-*Fasciola* IgG, for the subjects found to be carrying rheumatoid factors of IgM isotype (IgM-RF) and those found not to be carrying such factors. The horizontal lines indicate the mean values.

TABLE 3. The mean optical densities recorded in the *Fasciola* ELISA and the mean eosinophil counts, split by gender, residential setting, seropositivity/seronegativity in the ELISA, and positivity/negativity in the test for rheumatoid factors of the IgM subtype

Characteristic	Optical density in ELISA			Eosinophil count		
	Mean (S.D.) value	F	P	Mean (S.D.) no. of eosinophils/nl	F	P
GENDER						
Female	0.810 (0.450)	7.125	0.008	0.898 (0.589)	6.591	0.010
Male	0.730 (0.438)			1.003 (0.618)		
RESIDENTIAL SETTING						
Rural	0.814 (0.449)	8.691	0.003	0.936 (0.617)	0.061	0.805
Urban	0.725 (0.436)			0.946 (0.582)		
ELISA RESULT						
Seronegative	0.307 (0.211)	1807.2	0.001	0.959 (0.622)	3.160	0.076
Seropositive	1.479 (0.376)			0.871 (0.518)		
RHEUMATOID FACTORS						
Absent	0.758 (0.440)	9.336	0.002	0.930 (0.524)	1.528	0.217
Present	0.885 (0.461)			1.000 (0.928)		

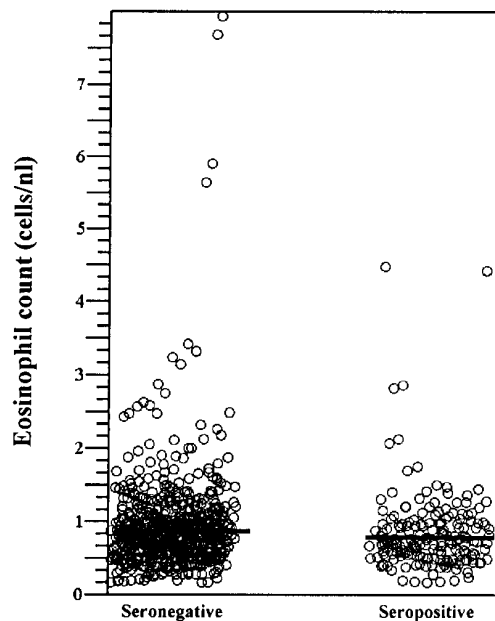


FIG. 2. The eosinophil counts recorded for the subjects found to be carrying rheumatoid factors of IgM isotype (IgM-RF) and those found not to be carrying such factors. The horizontal lines indicate the mean values.

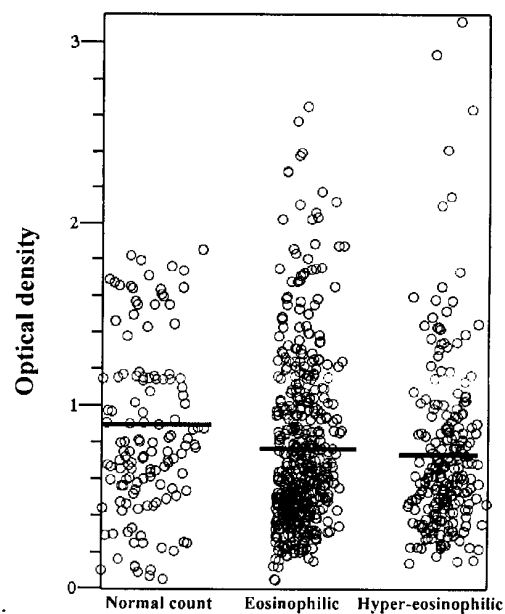


FIG. 3. The optical densities recorded, in the ELISA for the detection of anti-*Fasciola* IgG, for the subjects found to be have normal eosinophil counts, low eosinophil counts (indicative of eosinophilia) or very low eosinophil counts (indicative of hyper-eosinophilia). The horizontal lines indicate the mean values.

be confirmed by serology (using, for example, the IgG-ELISA employed in the present study). Curiously, in the present study, of patients who showed no symptoms of fascioliasis, not only did eosinophilia not indicate *Fasciola* infection (being, if anything, slightly more common in those found seronegative for *Fasciola* infection than in those found seropositive) but the level of eosinophilia was also found to decrease with increasing titre of anti-*Fasciola* IgG (as indicated by OD in the *Fasciola* ELISA). These surprising results may reflect the confounding effect of IgM-RF; almost all (91%) of the subjects found to be carrying IgM-RF had elevated eosinophil counts. Kobayashi *et al.* (2004) also found that eosinophil counts were significantly higher in those who carried rheumatoid factors than in those who appeared negative for such factors, concluding that serum levels of such factors reflect eosinophilia and asthma severity.

Oddly, given that gender does not appear to have a direct effect on the risk of eosinophilia (Moal *et al.*, 1990; Hanvivatvong *et al.*, 2003), the male patients investigated in the present study were significantly more likely to be eosinophilic than the female patients, even though they were less likely to be seropositive for *Fasciola* infection. Compared with the female patients, however, the males were less likely to be carrying IgM-RF, and carriage of IgM-RF appeared to greatly increase the risk of eosinophilia.

In the present study, the risk of human infection with *F. hepatica* appeared higher in the rural areas of the study hospital's catchment area than in urban Lugo, presumably reflecting variation in the levels of exposure to the trematode's human-infective metacercariae. Most people become infected with *F. hepatica* by eating watercress or other salad leaves, such as lettuce, alfalfa or spinach, on

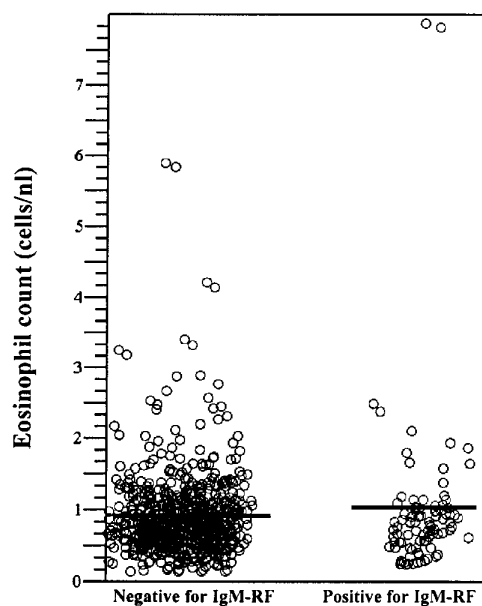


FIG. 4. The eosinophil counts recorded for the subjects found to be seronegative for anti-*Fasciola* IgG and those found seropositive. The horizontal lines indicate the mean values.

which the metacercariae have encysted (Marcos *et al.*, 2006). Infection via drinking water may also occur, albeit rarely (Mas-Coma *et al.*, 1995). The parasites on the salad leaves come from infected freshwater snails, which have themselves been infected by parasites excreted by ruminants grazing on pastures nearby, or applied, in manure from infected cattle or sheep, close to where the salad crops are grown. Fascioliasis is common in the cattle and sheep reared around Lugo, with recorded prevalences of 70% and 55%, respectively (Sánchez-Andrade *et al.*, 2000; Paz-Silva *et al.*, 2003). Although Marcos *et al.* (2006) suggested that human fascioliasis should be suspected in eosinophilic patients from livestock-rearing areas, and Safar *et al.* (2005) observed eosinophilia in 70.7% of their patients with fascioliasis, the present results indicate that, at least in north-western Spain, eosinophilia may not be a useful indicator of

(asymptomatic) human infection with *F. hepatica*.

It is unclear why, in the present study, the women living in rural areas were more likely to be carrying IgM-RF than the urban women, urban men or rural men. Little is known about the risk factors for the carriage of IgM-RF or many other auto-antibodies. A relationship between rheumatoid arthritis and contact with livestock and/or soil has been suggested but not confirmed (Kaplan *et al.*, 2005). If such a link exists, it may explain why, in the present study, carriage of IgM-RF and anti-*Fasciola* IgG appeared to be positively associated. Colebrook and Lightowers (1995), however, could find no evidence of an association between human cystic echinococcosis (a zoonosis connected to livestock and dogs) and levels of auto-antibodies.

Various mechanisms have been proposed to explain the production of auto-antibodies, such as the polyclonal activation of B cells and molecular mimicry (Roosnek and Lanzavecchia, 1991). In helminth infections, activation of the host's B cells results in a humoral immune response (Wynn, 1997). It is tempting to speculate that the persistence of immune complexes, caused by inefficient clearance or local production, may result in sustained T-cell help to the B cells that produce IgM-RF. As rheumatoid factors may be detectable in the blood for >10 years before the onset of any clinical disease (Nielen *et al.*, 2004), it may be difficult to identify the factors that have triggered their production.

This is the first study of the possible links between eosinophilia, IgM-RF and human fascioliasis in Spain. A significant association between eosinophilia and IgM-RF auto-antibodies was observed. Those living in rural regions have a relatively high risk of fascioliasis (or, at least, of developing IgG antibodies against *F. hepatica*). The influence of setting (rural *v.* urban) and gender on the presence of auto-antibodies and parasite-specific antibodies will be the subject of more studies in the future.

ACKNOWLEDGEMENTS. This work was partly supported by the *Xunta de Galicia's Consellería de Innovación e Industria* (via grant PGIDIT06BTF26101PR). The authors are grateful to B. Valcárcel for her critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Colebrook, A. L. & Lightowlers, M. W. (1995). Lack of an association between hydatid disease and autoimmunity. *Parasite Immunology*, **17**, 219–222.
- Costenbader, K. H., Feskanich, D., Mandl, L. A. & Karlson, E. W. (2006). Smoking intensity, duration, and cessation, and the risk of rheumatoid arthritis in women. *American Journal of Medicine*, **119**, 503.
- Goldbach-Mansky, R., Lee, J., McCoy, A., Hoxworth, J., Yarboro, C., Smolen, J. S., Steiner, G., Rosen, A., Zhang, C., Menard, H. A., Zhou, Z. J., Palosuo, T., Van Venrooij, W. J., Wilder, R. L., Klippel, J. H., Schumacher Jr, H. R. & El-Gabalawy, H. S. (2000). Rheumatoid arthritis associated autoantibodies in patients with synovitis of recent onset. *Arthritis Research*, **2**, 236–243.
- Hanvivatvong, O., Tirawatnpong, S., Kaowopas, Y. & Jitapankul, S. (2003). Prevalence of autoantibodies in Thai elderly. *Journal of the Medical Association of Thailand*, **86**, 242–249.
- Hillyer, G. & Apt, W. (1997). Food-borne trematode infections in the Americas. *Parasitology Today*, **13**, 97–98.
- Hillyer, G. V., Soler de Galanes, M., Rodríguez-Pérez, J., Bjorland, J., Silva de Lagrava, M., Ramírez-Guzmán, S. & Bryan, R. T. (1992). Use of the Falcon assay screening test–enzyme-linked immunosorbent assay (FAST–ELISA) and the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) to determine the prevalence of human fascioliasis in the Bolivian Altiplano. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **46**, 603–609.
- Kaplan, M., Kamanli, A., Kalkan, A., Kuk, S., Gulkesen, A., Ardicoglu, O. & Demirdag, K. (2005). Toxocariasis seroprevalence in patients with rheumatoid arthritis. *Turkiye Parazitoloji Dergisi*, **29**, 251–254.
- Kobayashi, M., Yasui, N., Ishimaru, N., Arakaki, R. & Hayashi, Y. (2004). Development of autoimmune arthritis with aging via bystander T cell activation in the mouse model of Sjögren's syndrome. *Arthritis and Rheumatism*, **50**, 3974–3984.
- Kwon, N. H., Oh, M. J., Lee, S. P., Lee, B. J. & Choi, D. C. (2006). The prevalence and diagnostic value of toxocariasis in unknown eosinophilia. *Annals of Hematology*, **85**, 233–238.
- Marcos, L., Maço, V., Samalvides, F., Terashima, A., Espinoza, J. R. & Gotuzzo, E. (2006). Risk factors for *Fasciola hepatica* infection in children: a case–control study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **100**, 158–166.
- Mas-Coma, S., Angles, R., Strauss, W., Esteban, J. G., Oviedo, J. A. & Buchon, P. (1995). Human fascioliasis in Bolivia: a general analysis and a critical review of existing data. *Research and Reviews in Parasitology*, **55**, 73–93.
- Masi, A. T., Aldag, J. C. & Chatterton, R. T. (2006). Sex hormones and risks of rheumatoid arthritis and developmental or environmental influences. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1069**, 223–235.
- Moal, M. C., Fauquert, P., Youinou, P., Lelong, A. & Le Goff, P. (1990). Comparison of radiologic lesions of rheumatoid polyarthritis in function of the presence or the absence of the rheumatoid factor IgA. *Revue du Rhumatisme et des Maladies Osteo-Articulaires (Paris)*, **57**, 613–617.
- Morand, E. F. (2005). New therapeutic target in inflammatory disease: macrophage migration inhibitory factor. *Internal Medicine Journal*, **35**, 419–426.
- Nielen, M. M., van Schaardenburg, D., Reesink, H. W., van de Stadt, R. J., van der Horst-Bruinsma, I. E., de Koning, M. H., Habibuw, M. R., Vandenbroucke, J. P. & Dijkmans, B. A. (2004). Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis and Rheumatism*, **50**, 380–386.
- O'Neill, S. M., Parkinson, M., Dowd, A. J., Strauss, W., Angles, R. & Dalton, J. P. (1999). Immunodiagnosis of human fascioliasis using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L1 cysteine proteinase. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **60**, 749–751.
- Paz-Silva, A., Sánchez-Andrade, R., Suárez, J. L., Pedreira, J., Arias, M., López, C., Panadero, R., Díaz, P., Díez-Baños, P. & Morondo, P. (2003). Prevalence of natural ovine fasciolosis shown by demonstrating the presence of serum circulating antigens. *Parasitology Research*, **91**, 328–331.
- Romasanta, A., Romero, J. L., Arias, M., Sánchez-Andrade, R., López, C., Suárez, J. L., Díaz, P., Díez-Baños, P., Morondo, P. & Paz-Silva, A. (2003). Diagnosis of parasitic zoonoses by immunoenzymatic assays. Analysis of cross-reactivity among the excretory/secretory antigens of *Fasciola hepatica*, *Toxocara canis*, and *Ascaris suum*. *Immunological Investigations*, **32**, 131–142.
- Roosnek, E. & Lanzavecchia, A. (1991). Efficient and selective presentation of antigen–antibody complexes by rheumatoid factor B cells. *Journal of Experimental Medicine*, **173**, 487–489.
- Safar, E., Mikhail, E., Bassiouni, G., El-Bassiouni, S. & El-Kholy, H. (2005). Human fascioliasis in some

- areas in Cairo and Giza governorates, Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, **35**, 181–192.
- Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., Suárez, J., Panadero, R., Díez-Baños, P. & Morondo, P. (2000). Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology*, **93**, 39–46.
- Szanto, A., Kiss, E., Sas, A., Szegedi, G. & Zeher, M. (2005). Association of systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Orvosi Hetilap*, **146**, 2533–2538.
- Tighe, H. & Carson, D. A. (1997). Rheumatoid factor. In *Textbook of Rheumatology*, eds Kelley, W. N., Harris, E. D., Ruddy, S. & Sledge, C. B. pp. 241–249. London: W. B. Saunders.
- Wardlaw, A. J. & Kay, A. B. (1987). The role of the eosinophil in the pathogenesis of asthma. *Allergy*, **42**, 321–335.
- Wynn, T. A. (1997). The debate over the effector function of eosinophils in helminth infection: new evidence from studies on the regulation of vaccine immunity by IL-12. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **92**, 105–108.

DÍEZ-MORRONGO C, SÁNCHEZ-ANDRADE R, ARIAS MS, SÁNCHEZ-ANDRADE R, SUÁREZ JL, FRANCISCO I, ROMASANTA A, MÉNDEZ A, MORRONGO P, DÍEZ-BAÑOS P, PAZ-SILVA A. (2010). Helminth-sensitization in patients with rheumatoid arthritis. **Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología**, 69: 163-171.

Artículo de Original

Helminth-sensitization in patients with rheumatoid arthritis

DÍEZ-MORRONGO C.¹, SÁNCHEZ-ANDRADE R.², ARIAS M.S.², SÁNCHEZ-ANDRADE A.³, SUÁREZ J.L.², FRANCISCO I.², ROMASANTA A.², MÉNDEZ A.², MORRONGO P.², DÍEZ-BAÑOS P.² and PAZ-SILVA A.²

¹ Rheumatological Diseases Department, Hospital Universitario (A Coruña, Spain).

² Animal Health, Epidemiology, Zoonoses and Parasitic Diseases, University of Santiago de Compostela, Faculty of Veterinary (Lugo, Spain).

³ Rheumatological Diseases Department, Hospital Xeral (Lugo, Spain).

ABSTRACT

A study to analyze the sensitization against helminth parasite antigens in patients with rheumatoid arthritis (RA) was carried out among adult patients attending the Rheumatology Services of a hospital in Lugo (NW) Spain. Blood samples were collected from 359 individuals randomly selected and checked for IgG against *F. hepatica* and *A. suum* by using an ELISA with their excretory/secretory products. Data were analyzed regarding the sex and living place of the patients. Overall, 34% (95% Confidence Interval 29, 39) of the cases were found positive to the RA, and significant differences according the sex were only obtained ($\chi^2 = 6.850$, $p = 0.009$), with the highest prevalence in women (40%; 33, 47). A seroprevalence of 12% (9, 15) for fasciolosis and 50% (45, 56) for ascariosis was found. People living in the countryside recorded the highest seroprevalences. Seropositive cases to fasciolosis were only recorded among RA patients. A seropositivity of 67% (58, 75) ascariosis among the RA persons was found, by 43% (36, 49) in the healthy ones ($\chi^2 = 18.177$, $p = 0.001$). A significant risk for developing IgG against *Fasciola hepatica* (prevalence ratio = 4.1) and *Ascaris suum* (PR = 1.9) in the RA cases was determined. The simultaneous analysis of the results showed the highest risk for helminth-sensitization among the RA patients living in rural areas. It is concluded that the habitat might influence the development of helminth-sensitization and RA.

Key words: Rheumatoid arthritis, helminth-parasites, sensitization, sex, age, living place.

RESUMEN

Se analizó la sensibilización frente a antígenos de helmintos parásitos en pacientes con artritis reumatoide (AR) del Servicio de Reumatología del Hospital Xeral-Calde de Lugo (España). Se obtuvieron muestras de sangre de 359 individuos seleccionados de forma aleatoria, en los que se investigó la presencia

Received: 14 September 2010. Accepted: 6 October 2010.

Corresponding: Adolfo Paz-Silva

Faculty of Veterinary, University of Santiago de Compostela. 27002-Lugo (Spain). Tel.: 0034982822126.

E-mail: adolfo.paz@usc.es

C. DIEZ-MORRONGO et al.

de anticuerpos IgG frente a *Fasciola hepatica* y *Ascaris suum* mediante ELISA (enzimo-inmunoensayo) y antígenos de excreción/secreción. Los resultados se relacionaron con el sexo y el lugar de residencia de los pacientes. El porcentaje de casos con AR fue del 33% (95% Intervalo Confianza 28, 38), y se encontraron diferencias significativas en función del sexo ($\chi^2 = 6,850$, $p = 0,009$), correspondiendo las mayores prevalencias a las mujeres (40%; 33, 47). La seroprevalencia de fasciolosis fue del 12% (9, 15) y la de ascariosis del 50% (45, 56). La población rural alcanzó las cifras más elevadas de seroprevalencia en ambos casos. Sólo se detectaron pacientes positivos a fasciolosis entre los que tenían también AR. La prevalencia de ascariosis resultó del 67% (58, 75) en los enfermos con AR, frente al 43% (36, 49) en los que no la padecían ($\chi^2 = 18,177$, $p = 0,001$). En los individuos con AR se demostró asociación con la presencia de anticuerpos frente al trematodo *F. hepatica* (razón de prevalencias = 4,1) y frente a *A. suum* (RP = 1,9). El análisis conjunto de estos resultados mostró un riesgo más elevado de sensibilización frente a antígenos de helmintos entre los individuos con AR que vivían en zonas rurales, de lo que se concluye que el hábitat influye en el desarrollo de anticuerpos frente a helmintos y en la presencia de artritis reumatoide.

Palabras clave: Artritis reumatoide, helmintos-parásitos, sensibilización, sexo, edad, lugar de residencia.

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis is a chronic inflammatory disease for which immunogenetic susceptibility factors have been defined. Different risk factors for developing RA as gender, age, smoking, coffee or alcohol have been reported (Heliövaara *et al.*, 2000; Reckner *et al.*, 2001; Rindfleisch and Müller, 2005; Costenbader *et al.*, 2006; Sokka *et al.*, 2009). The possible association between RA and sensitization with parasitic antigens has been previously reported (Doury, 1990; Sellami *et al.*, 2003; Marcos *et al.*, 2006). Among other sources, animals may act as a potential reservoir for putative environmental and pathogen agents that could stimulate chronic inflammation and then activate RA after a period of latency (Penglis *et al.*, 2000; Kaplan *et al.*, 2005).

Due to RA is a multifactorial disease that results from interactions between genetic and environmental factors, personal and lifestyle factors influence the course of the disease. In the last decades, people are changing their way of life, and movements from rural areas to urban ones and vice versa have occurred (Chaudhry *et al.*, 2009). The changes in the living-place can enhance the contact with different pathogens and antigens, especially for the different possibility for the presence of different species of animals, which can have some bearing on the humoral immune response (Allende *et al.*, 2008).

People living in rural areas are in marked contact to animal livestock (cattle, pigs and

sheep) (Gray y McPherson, 2005). Fasciolosis is a widespread zoonosis acquired by the ingestion of *Fasciola hepatica*-metacercariae in infected raw vegetables or in drinking water. This helminthosis affects mainly domestic and wild ruminants, horses and pigs, and it has been considered by the WHO as an emerging human disease in many countries (O'Neill *et al.*, 1999).

The species *Ascaris lumbricoides* is probably the most familiar parasite in humans. An almost identical worm, *A. suum*, occurs in pigs. The association between *Ascaris* infections in Danish patients and contact with pigs or pig manure has been reported (Nejsum *et al.*, 2005, 2006).

Previous investigations showed the simultaneous presence of IgM-Rheumatoid Factor and IgG against *F. hepatica* and *A. suum* in patients with eosinophilia (Sánchez-Andrade *et al.*, 2008, 2009). The main objective in the current work was to analyze the possibility of sensitization with helminth antigens (*F. hepatica* and *A. suum*) in RA patients. For this purpose, a serological survey was conducted and serum samples analyzed by using a modified ELISA with excretory/secretory antigens. Results were analyzed according the gender and the residence place of the individuals.

MATERIAL AND METHODS

Study population: A case-control experiment was developed between April and October 2008

HELMINTH-SENSITIZATION IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

among adult patients (Table 1) attending the Rheumatology Service at the Hospital Xeral (Lugo, NW Spain). According to the supervisor, fourteen persons were selected each week by using a software application in which all the patients are listed.

The diagnosis of RA was done according to the American Rheumatism Association (ACR) criteria (Arnett *et al.*, 1988; González-Gay *et al.*, 2006). Patients living in the city of Lugo were considered urban people, whereas persons living in country areas far away than 20 km were considered country population.

A total of 354 fecal and blood samples were collected with the donor's consent. Stool samples collected from the donors (one/patient) were all found negative for helminth eggs by means of coproscopic procedures (Sánchez-Andrade *et al.*, 2008).

Sera obtained from the blood samples were kept at -35°C until used for checking the seroprevalence (IgG) of the helminth parasite infections.

Antigen preparation: The excretory/secretory antigens of *F. hepatica* and *A. suum* were prepared according previous investigations (Sánchez-Andrade *et al.*, 2008, 2009). Briefly, first adult flukes were collected from the bile ducts of cattle killed in a local slaughterhouse, washed several times in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.5) and then incubated at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂ in RPMI medium for 6 hours.

For the collection of excretory/secretory antigens from *A. suum* 2nd stage larvae, adult worms were collected from swine guts at a local abattoir

and washed several times in PBS. Females were identified and dissected under stereomicroscope. *A. suum*-eggs collected from their uteri and after mechanical disruption of the eggs for obtaining the L2, the larvae were finally incubated in RPMI medium at 37°C and 5% CO₂ atmosphere for 6 hours.

ELISAs: The excretory/secretory antigens were used in an ELISA to evaluate the titers of anti-*Fasciola* or anti-*A. suum* IgG in each serum. For this assay, the wells of a microtiter plates were each coated with 100 µl (1 µg ml⁻¹) of the antigen preparation and incubated overnight at 4°C. After blocking for 30 min at 37°C with PBS containing 0.05% Tween and 1% skimmed milk (PTM; 250 µl/well), the test sera (diluted 1:100 in PTM) were incubated in the wells for 1 h at 37°C. After six washes in PBS, 100 µl of a 1:1000 dilution of horseradish-peroxidase-conjugated sheep anti-human IgG (heavy and light chains; Nordic Immunology Laboratories, Tilburg, Netherlands) in PTM were added to each well and incubated for 1 h at 37°C. Then 100 µl of a substrate mixture, consisting of 10 mg ortho-phenylenediamine in 12 ml citrate buffer (pH 5.0) and 10 µl 30% H₂O₂, were added to each well. After 15 min in the dark and at room temperature, the color reaction was stopped by the addition of 100 µl 1.5 M H₂SO₄ to each well, and then the optical densities (OD) of the well contents were read in a Multiskan spectrophotometer (Titertek Instruments, Huntsville, AL), at 492 nm.

In addition to the 354 test sera, a pool with 19 negative-control sera, from residents of Lugo

Table 1. Patient's distribution and diagnostic of *Fasciola hepatica*, *Ascaris suum* and helminth-sensitization

Diagnostics		Gender		Housing	
		Female (n = 205)	Male (n = 149)	City (n = 151)	Country (n = 203)
<i>Fasciola hepatica</i>	Pos (n = 44)	31	13	9	35
	Neg (n = 310)	174	136	142	168
<i>Ascaris suum</i>	Pos (n = 180)	111	69	67	113
	Neg (n = 174)	94	80	84	90
Sensitization	Pos (n = 204)	131	73	69	135
	Neg (n = 150)	74	76	82	68
RA	Pos (n = 120)	81	39	51	69
	Neg (n = 234)	124	110	100	134
Sensitization & RA	Pos (n = 104)	70	34	40	64
	Neg (n = 250)	135	115	111	139

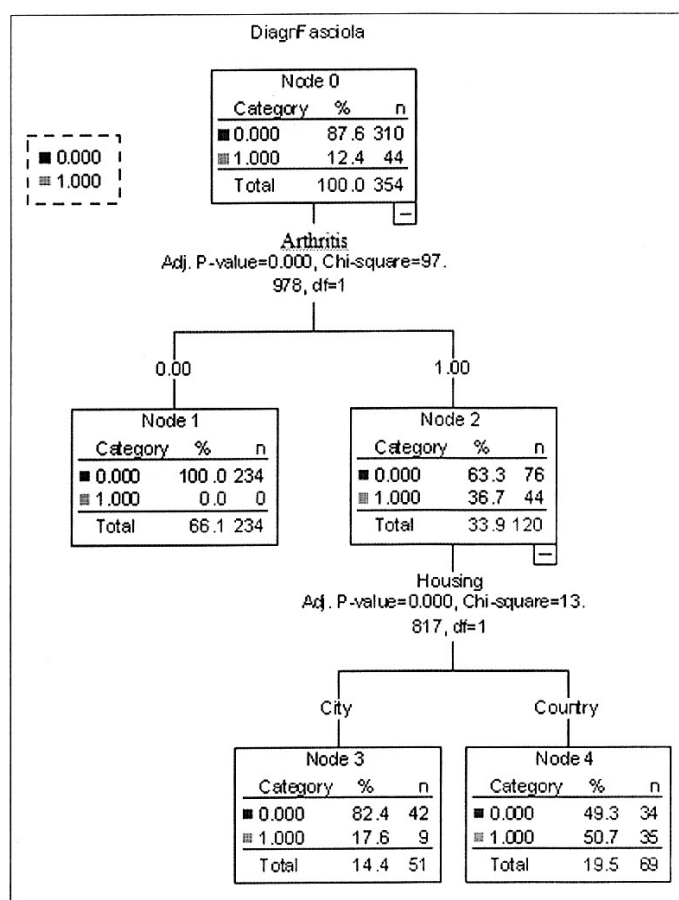


Figure 1a. Classification of the patients' seroprevalence regarding the RA diagnostics, housing and gender. a) Fasciolosis; b) Ascariosis; c) Helminth-sensitization.

whose stools had been found egg-negative when checked repeatedly over the 5 months prior to the serum collection, were also tested in each plate.

Cut-off estimation: A receiver operating characteristic (ROC) analysis was performed to determine the cut-off value for fasciolosis, by using the sera from 12 positive patients to the laparoscopy and 19 negative cases. Levels of sensitivity were plotted against the values of one minus specificity at each cut-off point on a ROC curve. The threshold value used was 0.3750 provided the highest values of sensitivity (85%) and specificity (83%).

A test serum was considered positive for anti-*Fasciola* IgG if it gave an OD that exceeded the

0.3750 value. Due to the non-probed existence of people infected by *A. suum*, the cut-off value was estimated as indicated by Sánchez-Andrade *et al.*, (2009).

Twelve of the negative-control sera and 10 positive-control sera (from residents of Lugo positive to the presence of *Fasciola* flukes by laparoscopy) were checked by the ELISA (to verify the sensitivity of the assay) and also in a similar assay based on the excretory/secretory antigens of *Toxocara canis* (to see if anti-*Fasciola* IgG might react with the *Toxocara* antigens) (Sánchez-Andrade *et al.*, 2008).

Statistical analysis: The percentages of sero-

HELMINTH-SENSITIZATION IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

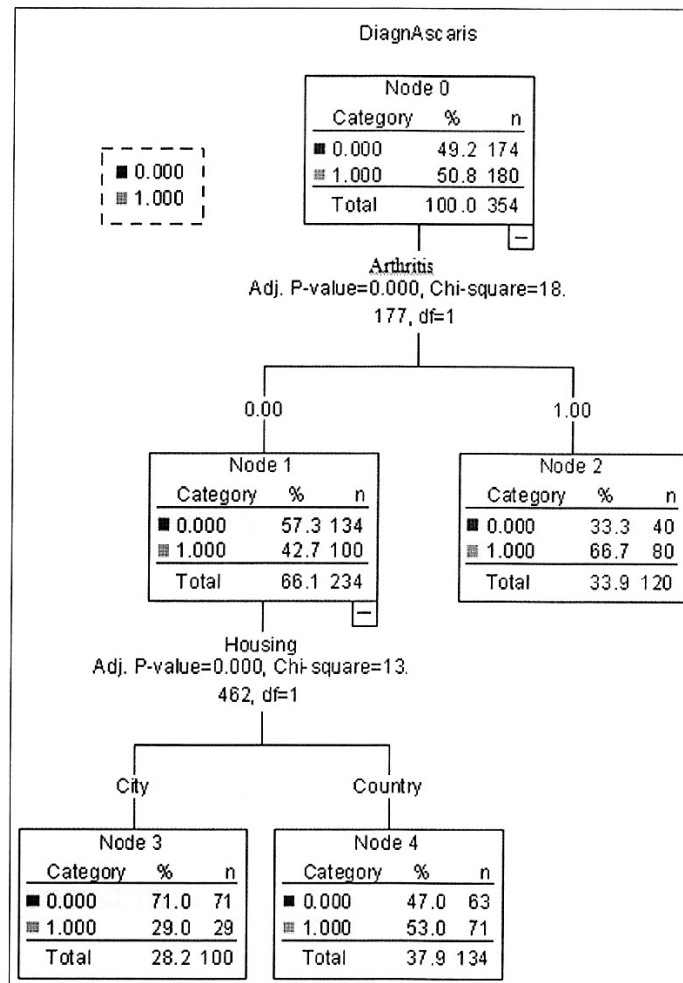


Figure 1b.

prevalence were expressed as the value and the 95% confidence interval, and analyzed by using the χ^2 test. Differences were considered as significant when $P < 0.05$.

The possible association between the breed, age, and seroprevalence was measured by calculating the odds ratio (OR) values when possible, and if not, by the estimation of the prevalence ratio (PR) values (Thrusfield, 2005).

All the data were classified by using the CHAID (Chi-square Automatic Interaction Detector) test. All tests were done using SPSS for Windows (15.0) (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTS

Rheumatoid arthritis: Overall, 34% (95% CI 29, 39) of the cases were found positive to the RA, and significant differences according the gender were obtained ($\chi^2 = 6.850$, $p = 0.009$), with a higher prevalence in the women (40%; 33, 46) than in men (26%; 19, 33) (Table 1). An OR value of 1.8 (1-2.7) was estimated for the women.

A similar prevalence of RA was recorded by considering the living place of the patients (34%), and significant differences were not recorded ($p > 0.05$).

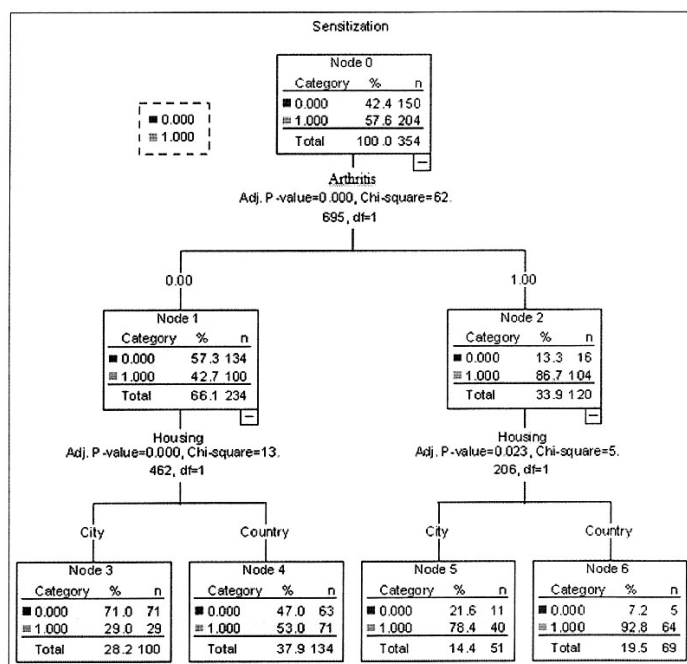


Figure 1c.

Seroprevalence of IgG against helminth parasite antigens

Fasciola hepatica: The seroprevalence of fasciolosis was 12% (9, 15), with the highest values among the women (15%; 10, 20) and the lowest in the men (9%; 4, 13) (Table 1). No differences were shown by means of the χ^2 test.

As reflected in Table 1, people living in the countryside achieved a significant higher percentage of seropositivity (17%; 12, 22) than that residing in the city (6%; 2, 10) ($\chi^2 = 10.124$, $p = 0.001$). An OR value of 3.3 (1.5-7) was estimated for the country population.

Seropositive cases to fasciolosis were only recorded among RA-positive patients (Table 2). A significant risk for RA in the patients with IgG anti-*F. hepatica* was achieved (prevalence ratio = 4.1), and the value for the statistical kappa was $\kappa = 0.434$ ($p = 0.001$).

By using the CHAID test, the multiple analysis of the seroprevalence of fasciolosis showed two groups regarding the RA diagnostics (Figure 1a). A second cluster in the RA positive patients according the housing was established, with the highest

seroprevalence in the people from rural areas.

Ascaris suum: As can be seen in Table 1, the percentage of patients seropositive to ascariasis was 51% (46, 56), with a prevalence of 54% (47, 61) in the women and 46% (38, 54) in the men ($\chi^2 = 2.121$, $p = 0.145$) (Table 1).

Significantly higher values of ascariasis seroprevalence in the countryside (56%; 49, 62) than in urban people (44%; 36, 52) were recorded. The estimation of the OR showed a value of 1.6 (1-2.4) for the inhabitants in rural areas.

A seroprevalence of 67% (58, 75) ascariasis among the RA-positive persons was found, by 43% (36, 49) in the RA-negative ones ($\chi^2 = 18.177$, $p = 0.001$). The OR estimation resulted 2.7 (1.7-4.2) for the cases with RA. The value of kappa was 0.213 ($p = 0.001$).

Figure 1b represents the multiple analysis of the seroprevalence of ascariasis by means of the CHAID test. The first cluster was formed in relation to the presence of RA, with the highest percentage in the positive patients. The group of the RA negative cases was divided into two clusters regarding their living place, and the most important lot was constituted by the countryside people.

HELMINTH-SENSITIZATION IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Sensitization and RA: The percentage of sensitized patients (seropositive to one of helminth antigen at least) was 58% (52, 63). The highest values were recorded among the feminine population (64%; 58, 71) ($\chi^2 = 7.855$, $p = 0.005$), and an OR value of 1.8 was achieved.

People living in the country reached a significantly highest percentage of sensitization (67%; 60, 63) ($\chi^2 = 15.352$, $p = 0.001$), with a 2.4 value for the OR.

Table 2 summarizes the analysis of sensitization and RA. Fifty-one (44, 58) percent of the sensitized-patients were positive to RA, whereas 11% (6, 16) were RA positive and non-sensitized ($\chi^2 = 62.695$, $p = 0.001$). By calculating the OR, a value of 8.7 was obtained, and 0.375 ($p = 0.001$) for the statistical kappa.

When considering only the sensitized patients positive to RA ($n = 104$), the highest percentage was observed among the women living in rural areas ($n = 44$), and the estimation of the OR was 2.4 ($\chi^2 = 4.475$, $p = 0.034$).

Patients were classified according the sensitization against parasite helminths into two groups in relation to the diagnostics of RA (Figure 1c), group 1 (the most numerous) formed by the RA-positive patients, and group 2 constituted by the RA-negative people. In a second division, two new clusters regarding the habitat were observed, and the highest prevalence was reached among the country living population.

DISCUSSION

Rheumatoid arthritis is a chronic multi-system disorder and current thinking favours the notion that interplay among genetic factors, sex hormones and an infectious agent initiates an autoimmune

disease mechanism that culminates in disease with inflammatory and destructive features (Maini, 1998). The detection of RA is frequently carried out on the basis of the criteria enunciated by the ACR. In the current work, the occurrence of RA in the thirty-four percent of the patients attending the Rheumatology Service at the Hospital Xeral (Lugo, NW Spain) was recorded, with a significantly higher prevalence in women than in men, in agreement with previous studies (Carmon *et al.*, 2002; Edwards & Cooper, 2006). It has been stated that the differences in sex hormones may be responsible for the gender-associated occurrence of RA (Cutolo *et al.*, 2002).

When RA occurs, the cartilage matrix is infiltrated by inflamed synovial tissue which finally destroys the joint. The mechanism initiating the process of inflammatory invasion remains unknown, but it is presumed to involve an active and self-perpetuating immune response as indicate the presence of large numbers of activated T-cells, macrophages, fibroblasts and plasma cells (Davies *et al.*, 1994). The role of bacterium-derived antigens has been pointed (Toivanen, 2003). After being digested in the intestine, these antigens can reach the systemic circulation and then could be entrapped in joints, where, after the activation of mast cells, an inflammatory response is triggered (Nigrovic *et al.*, 2007). By considering that mast cells are implicated both in the defence against bacteria and parasites, it seems very probable that parasite-antigens also can contribute to the occurrence of RA (Mangan *et al.*, 2000; Richter *et al.*, 2006). In a previous study (Sánchez-Andrade *et al.*, 2008) the relationship among seropositivity to fasciolosis, eosinophilia and the presence of rheumatoid factor was confirmed, which supports the association between the infection by parasitic helminths and several rheumatic disorders (Sellami *et al.*, 2003;

Table 2. Analysis of the helminth-sensitization regarding the RA diagnostics

Sensitization	Parasite	RA positive		RA negative		Total
			Total		Total	
YES	<i>F. hepatica</i>	44	104	0	100	204
	<i>A. suum</i>	80		100		
NON	<i>F. hepatica</i>	76	16	234	134	150
	<i>A. suum</i>	40		134		

C. DIEZ-MORRONGO et al.

Espinoza *et al.*, 2005).

In the present investigation, no coprological or clinical evidence of infection by either *F. hepatica* or *A. suum* was observed, thus the detection of antibodies against these helminths was related to the contact with the parasites and/or their antigens (Ikeda, 1998). Sensitization occurs after antigens are presented to the immune system and as a consequence the synthesis of specific antibodies is frequently enhanced (Marcos *et al.*, 2006). In the present study the seroprevalence of IgG against the helminths *Fasciola hepatica* and *Ascaris suum* was analyzed by using an ELISA with excretory/secretory antigens. Seropositive patients to fasciolosis were only found among the RA positive cases, with the highest percentage in the people living in the countryside. Sensitization with *F. hepatica* antigens requires the ingestion of metacercariae when eating watercress or other salad leaves, such as lettuce, alfalfa or spinach, or via drinking water (Mas-Coma *et al.*, 1995; Zacccone *et al.*, 2006). The parasites on the salad leaves come from infected freshwater snails, which have themselves been infected by parasites excreted by ruminants grazing on pastures nearby, or applied, in manure from infected cattle or sheep, close to where the salad crops are grown.

A significantly higher percentage of cases seropositive to ascariosis was also found in the RA positive patients. The risk for ascariosis recorded in patients from rural areas could be attributable to the pig farming conditions in the area of study, in which the breeding of a small number of pigs (1-4 pigs) is frequently observed. The possibility for sensitization with *A. suum* antigens is promoted by the manual elimination of manure and also by washing the pig guts in water-courses for the home-elaboration of sausages (Nejsun *et al.*, 2005).

It has been reported that infection with live helminth or challenge with their products (antigens or eggs) can delay the induction of autoimmune disease, reduce its severity or even prevent initiation of collagen-induced arthritis (CIA) in experimental models (Osada *et al.*, 2009). Nevertheless, it is noticeable underline that most of these assays have been carried out in animal models at different levels of inflammatory disorders, and a prolonged treatment regime is required for the efficacy of helminth-derived products.

Our results showed a fairly-moderate agreement between the helminth-antigen sensitization and the

RA, with most people living in the countryside residents. By considering that rheumatoid arthritis is a lifelong disease and the long-lasting persistence of antibodies after sensitization with parasitic antigens, it appears not possible to conclude if helminth-sensitization occurred before or after RA had developed. The observation of the highest percentages of helminth sensitization among the women RA patients living in the country points the life style increases their presentation. Further studies are in progress to explain if the helminth-sensitization induces the development of RA or vice versa.

REFERENCES

1. ALLENDE A, SELMA MV, LÓPEZ-GÁLVEZ F, VILLAESCUA R, GIL MI. 2008. Impact of wash water quality on sensory and microbial quality, including *Escherichia coli* cross-contamination, of fresh-cut escarole. *J Food Prot* 71: 2514-2518.
2. ARNETT FC, EDWORTHY SM, BLOCH DA, MC-SHANE DJ, FRIES JF, COOPER NS, HEALEY LA, KAPLAN SR, LIANG MH, LUTHRA HS. 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31: 315-24.
3. CARMONA L, VILLAVEDE V, HERNÁNDEZ-GARCÍA C, BALLINA J, GABRIEL R, LAFFON A. 2002. The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain. *Rheumatology* (Oxford) 41: 88-95.
4. CHAUDHRY R, PANDEY A, DAS A, BROOR S. 2009. Infection potpourri: are we watching? *Indian J Pathol Microbiol* 52: 125.
5. COSTENBADER KH, FESKANICH D, MANDI LA, KARLSON EW. 2006. Smoking intensity, duration, and cessation, and the risk of rheumatoid arthritis in women. *Am J Med* 119: 503.e1-9.
6. CUTOLO M, VILLAGGIO B, CRAVIOTTO C, PIZZORNI C, SERIOLO B, SULLI A. 2002. Sex hormones and rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 1: 284-289.
7. DAVIES ME, HORNER A, FRANZ B. 1994. Inter-cellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and MHC class II on chondrocytes in arthritic joints from pigs experimentally infected with *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 9: 265-272.
8. DOURY P. 1990. Is there a role for parasites in the etiology of inflammatory rheumatism? *Bull Acad Natl Med* 174: 743-751.
9. EDWARDS JC, COOPER C. 2006. Early environmental factors and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 143: 1-5.
10. ESPINOZA JR, TIMOTEO O, HERRERA-VELIT P. 2005. Fas2-ELISA in the detection of human infection by *Fasciola hepatica*. *J Helminthol* 79: 235-240.
11. GONZÁLEZ-GAY MA, GARCÍA-UNZUETA MT, DE MATÍAS JM, GONZÁLEZ-JUANATEY C, GARCÍA-

HELMINTH-SENSITIZATION IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

- PORRÚA C, SÁNCHEZ-ANDRADE A, MARTÍN J, LLORCA J. 2006. Influence of anti-TNF- α infliximab therapy on adhesion molecules associated with atherogenesis in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 24: 373-379.
12. GRAY MA, MCPHERSON KM. 2005. Cultural safety and professional practice in occupational therapy. *Aust Occup Ther J* 52: 34.
 13. HARNETT W, HARNETT MM. 2010. Helminth-derived immunomodulators: can understanding the worm produce the pill? *Nat Rev Immunol* 10: 278-284.
 14. HELIÖVAARA M, AHO K, KNEKT P, IMPIVAARA O, REUNANEN A, AROMAA A. 2000. Coffee consumption, rheumatoid factor, and the risk of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 59: 631-635.
 15. IKEDA T. 1998. Cystatin capture enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of human paragonimiasis and fascioliasis. *Am J Trop Med Hyg* 59: 286-290.
 16. KAPLAN M, KAMANLI A, KALKAN A, KUK S, GÜLKESEN A, ARDIÇOĞLU O, DEMIRDAĞ K. 2005. Toxocariasis seroprevalence in patients with rheumatoid arthritis. *Turk Paraz Derg* 29: 251-254.
 17. MAINI RN. 1998. Rheumatoid arthritis. A paradigm of inflammatory disease of the musculoskeletal system. *Acta Orthop Scand Suppl* 281: 6-13.
 18. MANGAN NE, FALLON RE, SMITH P, VAN ROOIJEN N, MCKENZIE AN, FALLON PG. 2000. Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-producing B cells. *J Immunol* 173: 6346-6356.
 19. MARCOS L, MAÇO V, SAMALVIDES F, TERASHIMA A, ESPINOZA JR, GOTUZZO E. 2006. Risk factors for *Fasciola hepatica* infection in children: a case-control study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100: 158-166.
 20. MARCOS L, MAÇO V, SAMALVIDES F, TERASHIMA A, ESPINOZA JR, GOTUZZO E. 2006. Risk factors for *Fasciola hepatica* infection in children: a case-control study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100: 158-166.
 21. MAS-COMAS S, ANGLES R, STRAUSS W, ESTEBAN JG, OVIEDO JA, BUCHON P. 1995. Human fascioliasis in Bolivia: a general analysis and a critical review of existing data. *Res Rev Parasitol* 55: 73-93.
 22. NEJSUM P, PARKER ED JR, FRYDENBERG J, ROEPSTORFF A, BOES J, HAQUE R, ASTRUP I, PRAG J, SKOV SØRENSEN UB. 2005. Ascariasis is a zoonosis in Denmark. *J Clin Microbiol* 43: 1142-8.
 23. NEJSUM P, PARKER ED, FRYDENBERG J, SØRENSEN UB, ROEPSTORFF A, PRAG J. 2006. Ascariasis is a zoonosis in Denmark-secondary publication. *Ugeskr Laeger* 168: 384-7.
 24. NIGROVIC PA, BINSTADT BA, MONACH PA, JOHNSEN A, GURISH M, IWAKURA Y, BENOIST C, MATHIS D, LEE DM. 2007. Mast cells contribute to initiation of autoantibody-mediated arthritis via IL-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 2325-2330.
 25. O'NEILL SM, PARKINSON M, DOWDAJ, STRAUSS W, ANGLES R, DALTON JP. 1999. Immunodiagnosis of human fascioliasis using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L1 cysteine proteinase. *Am J Trop Med Hyg* 60: 749-751.
 26. OSADA Y, SHIMIZU S, KUMAGAI T, YAMADA S, KANAZAWA T. 2009. *Schistosoma mansoni* infection reduces severity of collagen-induced arthritis via down-regulation of pro-inflammatory mediators. *Int J Parasitol* 39: 457-464.
 27. PENGLIS PS, BOND C, HUMPHREYS I, MCCLUSKEY J, CLELAND LG. 2000. Genetic susceptibility and the link between cat exposure and rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 30: 111-20.
 28. RECKNER OLSSON A, SKOGH T, WINGREN G. 2001. Comorbidity and lifestyle, reproductive factors, and environmental exposures associated with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 60: 934-939.
 29. RICHTER J, MÜLLER-STÖVER I, STROTHMEYER H, GÖBELS K, SCHMITT M, HÄUSSINGER D. 2006. Arthritis associated with *Strongyloides stercoralis* infection in HLA B-27-positive African. *Parasitol Res* 99: 706-707.
 30. RINDFLEISCH JA, MULLER D. 2005. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. *Am Fam Physician* 72: 1002-1004.
 31. SÁNCHEZ-ANDRADE A, SUÁREZ JL, ARIAS M, FRANCISCO I, DÍEZ C, CORTIÑAS J, ROMASANTA A, MORRONGO P, DÍEZ-BAÑOS P, PAZ-SILVA A, SÁNCHEZ-ANDRADE R. 2008. Relationships between eosinophilia, anti-*Fasciola* IgG, and IgM rheumatoid factors, in urban and rural areas of north-western Spain. *Ann Trop Med Parasitol* 102: 489-498.
 32. SÁNCHEZ-ANDRADE R, SÁNCHEZ-ANDRADE A, SUÁREZ JL, ARIAS M, FRANCISCO I, DÍEZ C, ROMASANTA A, MORRONGO P, DÍEZ-BAÑOS P, PAZ-SILVA A. 2009. Relationship among presence of antibodies against *Ascaris suum*, eosinophilia and autoantibodies (IgM-RF). *Intern J Appl Res Vet Med* 7: 57-62.
 33. SELLAMI H, ELLOUMI M, CHEIKHROUHOUE F, MAKNI F, BAKLOUTI S, AYADI A. 2003. *Fasciola hepatica* infestation with joint symptoms. *Joint Bone Spine* 70: 71-72.
 34. SELLAMI H, ELLOUMI M, CHEIKHROUHOUE F, MAKNI F, BAKLOUTI S, AYADI A. 2003. *Fasciola hepatica* infestation with joint symptoms. *Joint Bone Spine* 70: 71-72.
 35. SOKKA T, TOLOZA S, CUTOLO M, KAUTIAINEN H, MAKINEN H, GOGUS F, SKAKIC V, BADSHA H, PEETS T, BARANAUSKAITE A, GÉHER P, UJF-ALUSSY I, SKOPOULI FN, MAVROMMATI M, ALTEN R, POHL C, SIBILIA J, STANCATI A, SALAFFI F, ROMANOWSKI W, ZAROWNY-WIERZBINSKA D, HENROHN D, BRESNIHAN B, MINNOCK P, KNUDSEN LS, JACOBS JW, CALVO-ALLEN J, LAZOVSKIS J, PINHEIRO GDA R, KARATEEV D, ANDERSON D, REXHEPI S, YAZICI Y, PINCUS T; QUEST-RA Group. 2009. Women, men, and rheumatoid arthritis: analyses of disease activity, disease characteristics, and treatments in the QUEST-RA study. *Arthritis Res Ther* 11(1): R7.
 36. THRUSFIELD M. 2005. *Veterinary Epidemiology*, 3rd ed. Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, USA.
 37. TOIVANEN P. 2003. Normal intestinal microbiota in the aetiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 62: 807-811.
 38. ZACCONE P, FEHERVARI Z, PHILLIPS JM, DUNNE DW, COOKE A. 2006. Parasitic worms and inflammatory diseases. *Parasite Immunol* 28: 515-523.



5. Resumen y Discusión

Las posibilidades de contacto entre personas y animales se incrementan con la tenencia de mascotas, o mediante la explotación de animales de renta, lo que favorece la exposición a determinados agentes patógenos, que pueden afectar tanto a personas como a animales y que son responsables de enfermedades que se denominan **zoonosis**. Es importante tener en cuenta que el contacto con estos patógenos o sus antígenos no sólo puede provocar graves alteraciones en las personas al desarrollarse la infección, sino también otras repercusiones de naturaleza autoinmunitaria.

Existe un riesgo de exposición particularmente elevado a algunas formas de resistencia de parásitos helmintos, como por ejemplo sucede con huevos de nematodos ascáridos del género *Toxocara*, los cuales poseen una cubierta externa formada por tres capas que le confieren una notable resistencia, incluso en condiciones desfavorables y ello hace que las posibilidades de infección de personas y animales se prolonguen en el tiempo. Esta envoltura consta de una capa externa formada por polisacáridos y proteínas; otra intermedia constituida por un complejo quitín-proteico, y una interna (vitelina) a base de proteínas (25%) y lípidos (75%), que les permite también sobrevivir a la acción de diferentes productos desinfectantes, por lo que pueden mantener su infectividad durante meses, e incluso años (Ayçiçek *et al.*, 2001).

Para controlar la presencia de formas parasitarias de resistencia, en clínicas veterinarias, caniles, criaderos, granjas, etc. se emplean diferentes agentes desinfectantes, de probada acción frente a agentes microbianos, pero cuya actividad frente a los parásitos se desconoce. Por este motivo, en el **primer ensayo** de esta Tesis se evaluó la eficacia de tres productos empleados de forma rutinaria en instalaciones en las que se alojan perros, sobre el desarrollo embrionario de huevos de *Toxocara canis*, mediante técnicas *in vitro* e *in vivo*. En los estudios *in vitro*, los huevos del parásito se sometieron a la acción controlada de etanol, hipoclorito sódico y una mezcla comercial de cloruro de benzalconio y formaldehído. Después de un periodo de incubación de 24 días, se demostró que el etanol era el mejor desinfectante porque impedía el desarrollo larvario de *T. canis* en el interior de los huevos, seguido por el hipoclorito sódico que permitió el desarrollo del 50% de las formas de resistencia y finalmente por el preparado comercial que sólo degeneró el 25%. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Verocai *et al.* (2010). Por el contrario, Ayçiçek *et al.* (2001) afirmaron que el hipoclorito sódico no tenía efecto sobre la viabilidad de los huevos de *T. canis*, corroborando los datos obtenidos por Juris y Breza (1988). En investigaciones previas, Burg y Borgsteede (1987) afirmaron que productos como el fenol, cresol, hidróxido sódico y potasa, sales de amonio cuaternario glutaraldehído y formaldehído eran ineficaces sobre huevos embrionados y no-embriados de *A. suum*.

En el ensayo *in vivo* se administraron a ratones que son hospedadores paraténicos al igual que el hombre, huevos embrionados con L2 que habían resistido a la acción de los dos desinfectantes. La eficacia de los productos se determinó sobre el cerebro mediante la observación de larvas a los 24 días post-infección. No se encontraron lesiones ni larvas del nematodo en los ratones que recibieron larvas de *T. canis* tratadas con hipoclorito sódico, al contrario de lo que sucedió en los que se infectaron con huevos expuestos al desinfectante comercial. Estos resultados muestran que tanto el etanol como el hipoclorito sódico son apropiados para la desinfección de locales en los que se mantienen animales, debido a su completa eficacia frente a las fases infectantes de *T. canis*, por lo que se recomienda su uso en criaderos, caniles, jaulas y clínicas veterinarias para evitar el riesgo de infección de las personas. Chung *et al.* (2004) demostraron que al menos el 50% de huevos embrionados que se conservaron en formalina a 4°C durante 21 meses podían desarrollarse hasta las fases infectivas.

El conocimiento de que en el medio ambiente pueden encontrarse un gran número de formas de resistencia de parásitos helmintos con elevada resistencia a productos desinfectantes y condiciones climáticas adversas, nos indujo a considerar que el riesgo de exposición a estos parásitos o a sus derivados antigénicos podría ser importante en la población humana. El diagnóstico de algunas helmintozoonosis se puede realizar mediante técnicas coprológicas como la flotación (nematodos) o sedimentación (trematodos). Sin embargo, sólo se pueden aplicar en aquellas especies en las que se completa el ciclo endógeno (hospedadores definitivos). El principal helminto en perros es *T. canis*, y *A. suum* en el ganado porcino en explotaciones familiares. *Fasciola hepatica* es el trematodo de mayor prevalencia entre los rumiantes domésticos. De estas tres helmintozoonosis frecuentes en la Comunidad Autónoma Gallega, sólo la fasciolosis se puede detectar por coprología en personas (Sánchez-Andrade *et al.*, 2008).

En diferentes investigaciones se ha puesto de manifiesto que la infección por parásitos helmintos induce en los hospedadores una respuesta inmunitaria inicial de tipo Th1, definida por la producción de IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , que es reemplazada por otra de tipo Th2, definida por la síntesis de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 que inducen la diferenciación de linfocitos B a la producción de anticuerpos IgE (Finkelman *et al.*, 2004; Pearce *et al.*, 2005). En el **segundo estudio** se analizó la posible asociación entre la presencia de anticuerpos IgG frente a los antígenos de excreción/secreción de *Toxocara canis*, *Ascaris suum* y *Fasciola hepatica* y el lugar de residencia de las personas analizadas. Entre marzo de 2007 y enero de 2008 se recogieron muestras de sangre de 1.206 personas que se agruparon en función del lugar de residencia y del género. Se empleó la técnica inmunoenzimática ELISA para evaluar la presencia de anticuerpos séricos frente a antígenos de excreción/secreción de los helmintos (sensibilización).

El porcentaje de casos positivos a *T. canis* resultó del 13% (95% CI, 11-15), 45% (44-49) a *A. suum* y 23% (21-25) a *F. hepatica*. Se comprobó que, en general, el porcentaje de sensibilización fue significativamente superior en mujeres del ámbito rural. Además, los pacientes sensibilizados frente a estos helmintos presentaron recuentos más elevados de neutrófilos y el riesgo de desarrollo de anticuerpos IgG frente a los antígenos de *T. canis*, *A. suum* y *F. hepatica* fue superior en la población de áreas rurales; en este sentido, se evidenció que las mujeres residentes en zonas rurales mostraron mayor riesgo de sensibilización frente a *A. suum*. Entre las posibles causas de zoonosis se baraja la estrecha relación que se establece entre los animales y sus cuidadores, que unida a condiciones sanitarias precarias, favorece el contagio y desarrollo de ciertas enfermedades parasitarias (Gil y Sanmartino, 2002; Domenech *et al.*, 2006).

Los resultados del presente trabajo parecen confirmar que las posibilidades de contacto con diferentes antígenos guarda relación con el medio en el que se desenvuelven los individuos. (Macpherson, 2005). Sin embargo, aunque existe una creencia muy extendida acerca de que la población urbana tiene más cuidado de perros y gatos, y se le presume un contacto exagerado con sus mascotas, en el presente trabajo se obtuvo la seroprevalencia más elevada de toxocariosis en pacientes residentes en el campo, lo que coincide con investigaciones previas en Suecia (Ljungström y Van Knapen, 1989; Zwoliński, 2000).

En la población en estudio se observó una elevada seroprevalencia de ascariosis, que parece deberse a los hábitos de cría tradicional de los suidos en la Comunidad Autónoma Gallega. Las mujeres suelen encargarse de la alimentación del ganado, y también de la elaboración de productos alimenticios a partir de la carne de los animales, situaciones ambas que facilitan que su sistema inmunitario entre en contacto con antígenos de parásitos que afectan a los suidos. Se ha descrito que la cría de cerdos en explotaciones familiares propicia el contacto con diferentes organismos parasitarios (Bucardo *et al.*, 2005).

La exposición a antígenos de *A. suum* guarda estrecha relación con la presencia de ganado porcino. La ausencia de datos acerca de la prevalencia de ascariosis porcina en la región donde se llevó a cabo el presente estudio limita la discusión de los resultados obtenidos. Se ha detectado que el 21'5% de los suidos de los países nórdicos tienen animales que eliminan huevos de *A. suum* (Roepstorff *et al.*, 1999). La infección en población humana es relativamente escasa en esta área (2 casos/10.000 habitantes al año), con mayor frecuencia entre niños que visitan zonas rurales (36 casos/10.000 habitantes al año) (Nejsum *et al.*, 2005).

Pinelli *et al.* (2008) demostraron que el 7% de los niños de Holanda de 4 años de edad habían desarrollado anticuerpos frente a *A. suum*. Se estableció una asociación positiva entre la

seroprevalencia de anticuerpos, disnea, asma y sensibilización frente a alérgenos del aire, concluyendo que la infección breve o leve estimula la respuesta alérgica.

Es importante destacar que el contacto con huevos embrionados de *A. suum* se puede producir de diferentes formas, y no es necesaria la presencia de ganado porcino, puesto que los huevos de *A. suum* pueden sobrevivir a variaciones notables de temperatura, permaneciendo viables en el ambiente durante mucho tiempo (Bergstrom y Langeland, 1981). De este modo, la ingestión de vegetales frescos cultivados empleando estiércol de cerdo, o de hígado crudo de pollos o terneros pueden facilitar la ingestión de los huevos del ascárido (Vázquez-Tsuji *et al.*, 1997; Taira *et al.*, 2004).

Entre las formas más frecuentes de ingestión metacercarias de *F. hepatica* se ha destacado el consumo de ensaladas a base de berros, hojas de lechuga, alfalfa o espinacas producidas en áreas con importante presencia de rumiantes domésticos infectados (Marcos *et al.*, 2005). La fasciolosis es una trematodosis de amplia distribución en rumiantes de Galicia, como lo demuestra el hallazgo de porcentajes de infección del 70% en bovinos y 55% en ovinos (Sánchez-Andrade *et al.*, 2000; Paz-Silva *et al.*, 2003), lo que podría explicar el porcentaje de sensibilización obtenido en este estudio.

En diversas investigaciones se ha señalado que la infección por helmintos estimula no sólo la producción de anticuerpos, sino también la de algunos elementos celulares (linfocitos, eosinófilos, neutrófilos). Con tal motivo, el hallazgo de **eosinofilia** en pacientes se ha relacionado desde hace algún tiempo con infecciones parasitarias, así como fenómenos de alergia (Kwon *et al.*, 2006) y de desórdenes inmunitarios (Wardlaw y Kay, 1987). Se ha demostrado que los helmintos tienen la capacidad de modificar la respuesta inmunitaria de sus hospedadores, modulándola de forma que pueden reducir su intensidad, o incluso en opinión de algunos investigadores de inducir el desarrollo de fenómenos de autoinmunidad (Maizels y Yazdanbakhsh, 2003).

En el desarrollo de patología autoinmune intervienen anticuerpos y componentes mediados por células (Kim y Polychronakos, 2005). En ocasiones algunos pacientes presentan manifestaciones inflamatorias en las articulaciones debido a la liberación de antígenos parasitarios que inducen la formación de inmunocomplejos séricos que alcanzan el fluido sinovial (Doury, 1990).

Considerando los resultados obtenidos en el segundo ensayo, el principal objetivo de la **tercera parte del trabajo** consistió en analizar la posible relación entre la presencia de

eosinofilia, sensibilización frente al trematodo *Fasciola hepatica* y autoinmunidad. Para ello, se utilizaron muestras de sangre de 1264 pacientes con eosinofilia procedentes del Hospital Xeral de Lugo. En función del recuento de eosinófilos se establecieron 3 grupos, eosinofilia leve ($<0.5 \times 10^9/\text{litro}$), moderada ($0.5-3 \times 10^9/\text{litro}$) y elevada ($>3 \times 10^9/\text{litro}$). El grado de sensibilización frente al trematodo se determinó enfrentando los sueros a antígenos de excreción/secreción obtenidos de *F. hepatica* mediante una prueba de enzimoimmunoensayo (ELISA). Se empleó asimismo una técnica de aglutinación en látex para poner en evidencia la presencia de autoanticuerpos FR-IgM.

Los resultados determinaron que el 21% de los pacientes mostraban sensibilidad frente a antígenos del trematodo *F. hepatica* y que el 15% tenían FR-IgM. La población femenina de áreas rurales presentaban las seroprevalencias más elevadas de infección por *Fasciola hepatica* y de autoinmunidad, mientras que los varones residentes en el medio rural tenían los porcentajes más altos de eosinofilia. Es importante destacar que las mujeres suelen encargarse de la alimentación del ganado, y también de la elaboración de productos alimenticios a partir de la carne de los animales, situaciones ambas que facilitan que su sistema inmunitario entre en contacto con antígenos de parásitos que afectan a rumiantes (*Fasciola*) a los suidos (*Ascaris*).

Los pacientes no sensibilizados mostraban mayor eosinofilia que los sensibilizados, lo que parece indicar paradójicamente que el contacto con formas parasitarias no siempre aumenta la eosinofilia y que ésta puede obedecer a muy diversas causas (Hanvivatvong *et al.*, 2003). Sin embargo, sí se observó relación entre la presencia de autoanticuerpos FR-Ig y la eosinofilia, lo que coincide con la hipótesis sugerida por Kaplan *et al.* (2005) acerca de la relación entre la producción de autoanticuerpos y el contacto con ganado o con el suelo.

De los resultados obtenidos se deduce que en el área de estudio, los residentes en zonas rurales tienen más probabilidad de exposición a antígenos de *F. hepatica* que los residentes en áreas urbanas y que el desarrollo de eosinofilia y de autoinmunidad están relacionados. Se ha demostrado la coincidencia de FR y de infecciones parasitarias en casos de anisakiosis (Cuende *et al.*, 1998), esquistomosis (Rolland *et al.*, 1998) ascariosis (Carballada *et al.*, 1998) y strongiloidosis (Brocq *et al.*, 1996; Richter *et al.*, 2006).

Ante los datos obtenidos en este tercer estudio, y puesto que la sensibilización frente a antígenos de *A. suum* fue muy elevada en la zona de estudio, como se demostró en el segundo ensayo, nos planteamos un **cuarto trabajo** para verificar la hipótesis de que la exposición a este ascárido pudiera estar relacionado de alguna forma con la respuesta eosinófila y la autoinmunidad. Se utilizaron sueros de 1264 pacientes que vivían habitualmente en medio

rural o urbano y que además presentaban eosinofilia. La sensibilización frente al ascárido se evaluó mediante ELISA con antígeno de excreción/secreción de *A. suum*. Se utilizó también una prueba de aglutinación en látex para determinar los niveles de autoanticuerpos FR-IgM.

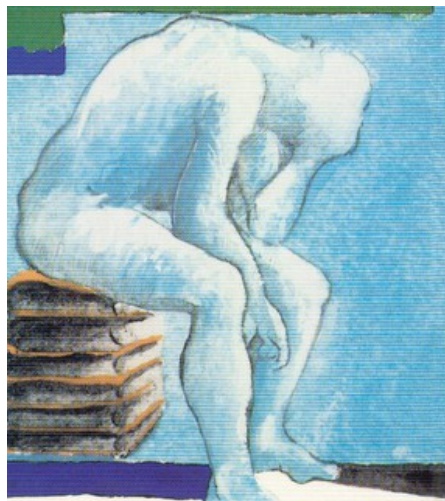
Como en el estudio anterior, se comprobó que la población que vive en el medio rural tiene mayor probabilidad de sensibilizarse frente a *A. suum* y se demostró asimismo una relación positiva entre la eosinofilia y el desarrollo de autoanticuerpos FR-IgM. En este ensayo, nuevamente se observó que los porcentajes más elevados de sensibilización frente a antígenos de *A. suum* y de autoinmunidad correspondieron a mujeres que residían en áreas rurales, mientras que los hombres presentaron los valores más altos de eosinofilia.

Finalmente, planteamos un **quinto estudio** con objeto de comprobar la posible relación entre la artritis reumatoide y el nivel de sensibilización de estos pacientes a antígenos de *F. hepatica* y *A. suum*. En el Servicio de Reumatología del Hospital Xeral de Lugo, se seleccionaron de forma aleatoria 359 personas en las que se determinó si padecían artritis reumatoide basados en los criterios de la Asociación Americana de Reumatología. Además, mediante ELISA, se determinó la presencia de anticuerpos IgG frente a *Fasciola hepatica* y *Ascaris suum*. Los resultados se analizaron teniendo en cuenta el sexo y el modo de vida de los pacientes.

El porcentaje de pacientes en los que se diagnosticó artritis reumatoide fue del 33% y se encontraron diferencias significativas en función del sexo, correspondiendo la mayor prevalencia a las mujeres. Como en los estudios anteriores, se comprobó que la población rural presentaba seroprevalencia positiva más alta a *F. hepatica* y *A. suum* que la urbana.

Se debe destacar que solo se detectaron anticuerpos de *F. hepatica* en los pacientes con artritis reumatoide y que la seroprevalencia de *A. suum* fue más alta en personas diagnosticadas de artritis reumatoide.

El análisis conjunto de los resultados obtenidos indica la probabilidad significativamente más elevada de sensibilización frente a antígenos de helmintos entre los individuos con artritis reumatoide que viven en zonas rurales, lo que sugiere que el hábitat y el modo de vida están estrechamente relacionados con el grado de desarrollo de anticuerpos frente a estos helmintos y con la artritis reumatoide.



6. Conclusiones

De los resultados obtenidos en el presente estudio hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1ª.- La elevada seroprevalencia de anticuerpos frente a *Toxocara canis*, *Ascaris suum* y *Fasciola hepatica* en las personas que habitan en Galicia, indica que la posibilidad de exposición a fases infectivas de estos parásitos es importante.

2ª.- Los huevos de *Toxocara canis* son muy resistentes a la mayoría de los desinfectantes utilizados habitualmente para la limpieza de locales donde se mantienen perros. El etanol al 70% es el desinfectante de elección, puesto que impide el desarrollo embrionario *in vitro* de los huevos del parásito.

3ª.- El mantenimiento de huevos embrionados de *T. canis* en hipoclorito sódico anula su capacidad infectiva *in vivo*, al contrario que cuando se exponen a un desinfectante comercial (cloruro de benzalconio y formaldehído), lo que sugiere que el empleo de este producto no elimina el riesgo de infección para los hospedadores paraténicos, incluido el hombre.

4.- La población del medio rural, en especial las mujeres, presenta mayor riesgo de exposición a *T. canis*, *A. suum* y *F. hepatica*, probablemente debido a que habitualmente se encargan de algunas tareas agrícolas y de la elaboración de los productos alimenticios a partir de la carne de los animales, y de esta forma tienen más posibilidades de sensibilización frente a estos helmintos.

5ª.- La sensibilización frente a *F. hepatica* y *A. suum* coincide con el desarrollo de eosinofilia y de autoanticuerpos FR-IgM.

6ª.- La presencia de anticuerpos frente a *F. hepatica* y *A. suum* está relacionada con el padecimiento de artritis reumatoide, especialmente en los pacientes que viven en el medio rural. Existe asociación entre la artritis reumatoide y el sexo de los pacientes, siendo las mujeres las que presentan mayor posibilidad de padecer esta enfermedad.



7. Bibliografía

- Acha P, Szyfres B. (2003). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3ª edición. **Vol. III. Parasitosis**. Ed. Organización Panamericana de la Salud.
- Ajayi OO, Duhlinska DD, Agwale SM, Njoku M. (2000). Frequency of human toxocariasis in Jos, Plateau State, Nigeria. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **95**: 147-149.
- Akdemir C. (2010). Visceral larva migrans among children in Kütahya (Turkey) and an evaluation of playgrounds for *T. canis* eggs. *Turk J Pediatr.*, **52**: 158-162.
- Albonico M, Crompton DW, Savioli L. (1999). Control strategies for human intestinal nematode infections. *Adv Parasitol.*, **42**: 277-341.
- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Ménard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovský J, Wolfe F, Hawker G. (2010). Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.*, **62**: 2569-2581.
- Al-Jabri AA, Al Belushi MS, Nsanze H. (2003). Frequency and levels of autoantibodies in healthy adult Omanis. *Ann. Saudi Med.*, **23**: 372-375.
- Anagnostopoulos I, Zinzaras E, Alexiou I, Papathanasiou AA, Davas E, Koutroumpas A, Barouta G, Sakkas LI. (2010). The prevalence of rheumatic diseases in central Greece: a population survey. *BMC Musculoskelet Disord.*, **11**: 98.
- Andrade MA, Siles-Lucas M, López-Abán J, Carranza C, Pérez-Arellano JL, Muro A. (2005). Antigens from *Ascaris suum* trigger *in vitro* macrophage NO production. *Parasite Immunol.*, **27**: 235-242.
- Andrade MA, Siles-Lucas M, López-Abán J, Carranza C, Pérez-Arellano JL, Muro A. (2005). Antigens from *Ascaris suum* trigger *in vitro* macrophage NO production. *Parasite Immunol.*, **27**: 235-242.
- Angulo-Madero R, Puerto CA de la, Guillén-Llera JL, De la Puerto CA, Águila de la Puente C. (1987). Contamination of the soils of public parks with *Toxocara canis*. *Rev. Ibér. Parasitol.*, **Vol. Extraordinario**: 165-171.
- Anuradha V, Chopra A. (2005). In the era of nephelometry, latex agglutination is still good enough to detect rheumatoid factor. *J Rheumatol.*, **32**: 2343-2344.
- Arias MS. (2001). Estudio de reacciones cruzadas de sueros ovinos con fasciolosis frente a diversos antígenos parasitarios. **Memoria de Licenciatura**. Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.

- Arias MS. (2007). Obtención de proteínas recombinantes útiles para el diagnóstico de fasciolosis ovina. **Tesis Doctoral**. Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS (1988). The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **31**: 315-24.
- Aupperle KR, Alsalameh S, Stock KP, Burmester GR, Kalden JR. (1996). Comparison of rheumatoid test procedures--value and critical interpretation of sensitivity and specificity and their effect on pre-test and post-test probability. *Z Rheumatol.*, **55**: 158-167.
- Auriault C, Pestel J, Joseph M, Dessaint JP, Capron A. (1981). Interaction between macrophages and *Schistosoma mansoni* schistosomula: role of IgG peptides and aggregates on the modulation of beta-glucuronidase release and the cytotoxicity against schistosomula. *Cell Immunol.*, **62**: 15-27.
- Avouac J, Gossec L, Dougados M. (2006). Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Ann Rheum Dis.*, **65**: 845-851.
- Ayçiçek H, Yarsan E, Sarimehmetoglu HO, Tanyüksel M, Girginkardesler N, Özyurt M. (2001). Efficacy of some disinfectants on embryonated eggs of *Toxocara canis*. *Turkish J. Med. Sci.*, **31**: 35-39.
- Baboolal S, Rawlins SC. (2002). Seroprevalence of toxocarasis in schoolchildren in Trinidad. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, **96**: 139-143.
- Bach JF. 2002 The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med.*, **347**: 911-920.
- Bacher M, Metz CN, Calandra T, Mayer K, Chesney J, Lohoff M, Gemsa D, Donnelly T, Bucala R. (1996). An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **93**: 7849-7854.
- Baixench M, Magnaval J, Dorchies P. (1992). Épidémiologie de la toxocarose chez les étudiants de l'École nationale vétérinaire de Toulouse. *Rev. Méd. Vét.*, **143**: 749-752.
- Banchuin N, Janyapoon K, Sarntivijai S, Parivisutt L. (1992). Re-evaluation of ELISA and latex agglutination test for rheumatoid factor detection in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Asian Pac J Allergy Immunol.*, **10**: 47-54.
- Barcelos F, Abreu I, Patto JV, Trindade H, Teixeira A. (2009). Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in Sjögren's syndrome. *Acta Reumatol Port.*, **34**: 608-12.

- Bas S, Perneger TV, Kunzle E, Vischer TL. (2002). Comparative study of different enzyme immunoassays for measurement of IgM and IgA rheumatoid factors. *Ann Rheum Dis*, **61**: 505-510.
- Bass J, Mehta KA, Glickman LT, Blocker R, Eppes BM. (1987). Asymptomatic toxocariasis in children. A prospective study and treatment trial. *Clin Pediatr*, **26**: 441-446.
- Beer SA, Novosil'tsev GI, Mel'nikova LI. (1999). The role of the water factor in the dissemination of *Toxocara* eggs and the spread of toxocariasis in a megalopolis. *Parazitologiya*, **33**: 129-135.
- Berglin E, Padyukov L, Sundin U, Hallmans G, Stenlund H, Van Venrooij WJ, Klareskog L, Dahlqvist SR. (2004). A combination of autoantibodies to cyclic citrullinated peptide (CCP) and HLA-DRB1 locus antigens is strongly associated with future onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, **6**: 303-308.
- Bergstrom K, Langeland G (1981) Survival of *Ascaris* eggs, *Salmonella* and fecal coli in soil and on vegetables grown in infected soil. *North Vet Med*, **33**: 23-32.
- Bhatia SS, Majka DS, Kittelson JM, Parrish LA, Ferucci ED, Deane KD, Arend WP, Rewers M, Michael Holers V, Norris JM. (2006). Rheumatoid factor seropositivity is inversely associated with oral contraceptive use in women without rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, **66**: 267-269.
- Bond C, Cleland LG. (1996). Rheumatoid arthritis: are pets implicated in its etiology?. *Semin Arthritis Rheum*, **25**: 308-317.
- Bouchet F, Leger N. (1983). Structure de l'oeuf de *Toxocara canis* (WERNER, 1782) (Nematoda Ascarididae). *Bull Soc Fr Parasitol*, **1**: 133-138.
- Bovin LF, Rieneck K, Workman C, Nielsen H, Sørensen SF, Skjødt H, Florescu A, Brunak S, Bendtzen K. (2004). Blood cell gene expression profiling in rheumatoid arthritis. Discriminative genes and effect of rheumatoid factor. *Immunol Lett*, **93**: 217-226.
- Bresciani M, Parisi C, Menghi G, Bonini S. (2005). The hygiene hypothesis: does it function worldwide?. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, **5**: 147-151.
- Brooks PM. (2006). The burden of musculoskeletal disease—a global perspective. *Clin Rheumatol*, **25**: 778-781.
- Bucardo F, Meza-Lucas A, Espinoza F, García-Jerónimo RC, García-Rodea R, Correa D. (2005). The seroprevalence of *Taenia solium* cysticercosis among epileptic patients in León, Nicaragua, as eventually by ELISA and western blotting. *Ann Trop Med Parasitol*, **99**: 41-45.
- Buening J, Homann N, von Smolinski D, Borchertding F, Noack F, Stolte M, Kohl M, Lehnert H, Ludwig D. (2008). Helminths as governors of inflammatory bowel disease. *Gut*, **57**: 1182-1183.

- Bugatti S, Codullo V, Caporali R, Montecucco C. (2007). B cells in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.*, **7**: 137-142.
- Buijs J, Borsboom G, Renting M, Hilgersom WJ, van Wieringen JC, Jansen G, Neijens J. (1997). Relationship between allergic manifestations and *Toxocara* seropositivity: a cross-sectional study among elementary school children. *Eur Respir J.*, **10**: 1467-1475.
- Bundy DA, Cooper ES. (1989). Trichuris and trichuriasis in humans. *Adv Parasitol.*, **28**: 107-173.
- Burg WPJ, Borgsteede FH (1987). Effects of various disinfectants on the development and survival possibilities of the pre-parasitic stages of *Ostertagia ostertagi*, *Cooperia oncophora* and *Ascaris suum*. *Tijdschr Diergeneesk.*, **11**: 769-778.
- Burke TM, Roberson EL. (1985). Prenatal and lactational transmission of *Toxocara canis* and *Ancylostoma caninum*: experimental infection of the bitch at midpregnancy and at parturition. *Int J Parasitol.*, **5**: 485-490.
- Calvo I, López B, Marco A, Maneiro JR, Díez C, Espiño-Lorenzo P. (2010). Experience in the treatment with etanercept in patients with juvenile idiopathic arthritis under 4 years. *Proceedings 17th Pediatric Rheumatology European Society Congress and 8º Congreso de la Sociedad Española de Reumatología Pediátrica*, 92-93.
- Callender JE, Grantham-McGregor S, Walker S, Cooper ES. (1992). Trichuris infection and mental development in children. *Lancet*, **339**: 181.
- Cancrini G, Bartoloni A, Zaffaroni E, Guglielmetti P, Gamboa H, Nicoletti A, Genchi C. (1998). Seroprevalence of *Toxocara canis*-IgG antibodies in two rural Bolivian communities. *Parassitologia*, **40**: 473-475.
- Carballada Rico C, Ameneiros Lago E, González Moraleja A, Sesma Sánchez P. (1998). Outbreak of Reiter's syndrome caused by *Ascaris lumbricoides*. *Rev Clin Esp.*, **198**: 714.
- Carvalho LS, Correa H, Silva GC, Campos FS, Baião FR, Ribeiro LS, Faria AM, d'Avila Reis D. (2008). May genetic factors in fibromyalgia help to identify patients with differentially altered frequencies of immune cells?. *Clin Exp Immunol.*, **154**: 346-352.
- Cilla G, Pérez-Trallero E, Gutiérrez C, Part C, Gomáriz M. (1996). Seroprevalence of *Toxocara* infection in middle-class and disadvantaged children in northern Spain (Gipuzkoa, Basque Country). *Eur J Epidemiol.*, **12**: 541-543.
- Colley DG, LoVerde PT, Savioli L. (2001). Infectious disease. Medical helminthology in the 21st century. *Science*, **293**: 1437-1438.
- Colli CM, Rubinsky-Elefant G, Paludo ML, Falavigna DL, Guilherme EV, Mattia S, Araújo SM, Ferreira EC, Previdelli IT, Falavigna-Guilherme AL. (2010). Serological, clinical and epidemiological evaluation of toxocariasis in urban areas of south Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **52**: 69-74.

- Comi R, Percoco A, Molinaro MG, Zanasi F. (2000). Gli alimenti: possibile veicolo di trasmissione di *Toxocara canis* all'uomo. *Riv Sci Aliment.*, **29**: 1-13.
- Conde Garcia L, Muro Álvarez A, Simón Martín F. (1989). Epidemiological studies on toxocariasis and visceral larva migrans in a zone of western Spain. *Ann Trop Med Parasitol.*, **83**: 615-620.
- Cooke A, Zaccane P, Raine T, Phillips JM, Dunne DW. (2004). Infection and autoimmunity: are we winning the war, only to lose the peace?. *Trends Parasitol.*, **20**: 316-321.
- Crompton DW. (2001). Ascaris and ascariasis. *Adv Parasitol.*, **48**: 285-375.
- Cuéllar C, Fenoy S, Guillén JL. (1992). Cross reactions of sera from *Toxocara canis* infected mice with *Toxascaris leonina* and *Ascaris suum* antigens. *Int J Parasitol.*, **22**: 301-307.
- Cuende E, Audicana MT, García M, Anda M, Fernández Corres L, Jiménez C, Vesga JC. (1998). Rheumatic manifestations in the course of anaphylaxis caused by *Anisakis simplex*. *Clin Exp Rheumatol.*, **16**: 303-304.
- Chan MS, Medley GF, Jamison D, Bundy DA. (1994). The evaluation of potential global morbidity attributable to intestinal nematode infections. *Parasitology*, **109**: 373-387.
- Chan-Yeung M, Zhang LX, Tu DH, Li B, He GX, Kauppinen R, Nieminen M, Enarson DA. (2002). The prevalence of asthma and asthma-like symptoms among adults in rural Beijing, China. *Eur Respir J.*, **19**: 853-858.
- Chaturvedi P, Gawdi AM, Parkhe K, Harinath BC, Dey SK. (1993). Arthritis in children: an occult manifestation of Bancroftian filariasis. *Indian J Pediatr.*, **60**: 803-807.
- Chiodo P, Basualdo J, Ciarmela L, Pezzani B, Apezteguía M, Minvielle M. (2006). Related factors to human toxocariasis in a rural community of Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **101**: 397-400.
- Chung LY, Fang BH, Chang JH, Chye SM, Yen CM (2004). The infectivity and antigenicity of *Toxocara canis* eggs can be retained after long-term preservation. *Ann Trop Med Parasitol.*, **98**: 251-260.
- Chung EY, Kim SJ, Ma XJ. (2006). Regulation of cytokine production during phagocytosis of apoptotic cells. *Cell Res.*, **16**: 154-161.
- Da Mota LM, dos Santos Neto LL, Burlingame R, Ménard HA, Laurindo IM. (2010). Laboratory characteristics of a cohort of patients with early rheumatoid arthritis. *Rev Bras Reumatol.*, **50**: 375-388.
- De Corral VR, Lozano-García J, Ramos-Corona LE. (1990). An unusual case of systemic toxocariasis. *Bol Med Hosp Infant Mex.*, **47**: 841-844.
- Degouy A, Menat C, Aubin F, Piarroux R, Woronoff-Lemsi MC, Humbert P. (2001). Toxocariasis. *Presse Medicale*, **30**: 1933-1938.

- Demirci M, Korkmaz M, Sakrun N, Kaya S, Kuman A. (2002). Diagnostic importance of serological methods and eosinophilia in tissue parasites. *J. Health Popul Nutr.*, **20**: 352-355.
- Demirci M, Yildirim M, Aridogan BC, Baysal V, Korkmaz M. (2003). Tissue parasites in patients with chronic urticaria. *J Dermatol.*, **30**: 777-781.
- Despommier D. (2003). Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clin Microbiol Rev.*, **16**: 265-272.
- Díez Morrondo, C. (2007). Seroprevalencia de toxocariosis y factor reumatoide en pacientes con eosinofilia. **Trabajo de Investigación Tutelado**. Universidade de Santiago de Compostela.
- Díez-Morrondo C, Graña J, Freire M, Palmou N, López-Sánchez C, Sánchez-Meizoso MO, Atanes A, Galdo F. (2008). Infliximab y Enfermedad de Behçet. *Reumatol Clin.*, **4**: 101.
- Díez-Morrondo, C., Lema Gontad, J.M., Álvarez Rivas, N., Atanes Sandoval, A., De Toro Santos, F.J., Pinto Tasende, J.A., Galdo, F. (2010). Aspectos actuales del síndrome de Sjögren: etiopatogenia, manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento. *Semin Fund Esp Reumatol.*, **11**: 70-76.
- Domenech J, Lubroth J, Eddi C, Martin V, Roger F. (2006) Regional and and international approaches on prevention and control of animal transboundary and emerging diseases. *Ann N Y Acad Sci.*, **1081**: 90-107.
- Doury P. (1990). Is there a role for parasites in the etiology of inflammatory rheumatism? *Bull Acad Natl Med.*, **174**: 743-751.
- Edwards CJ, Arden NK, Fisher D, Saperia JC, Reading I, Van Staa TP, Cooper C. (2005). The changing use of disease-modifying anti-rheumatic drugs in individuals with rheumatoid arthritis from the United Kingdom General Practice Research Database. *Rheumatology (Oxford)*. **44**: 1394-1398.
- Edwards CJ, Cooper C. (2006). Early environmental factors and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.*, **143**: 1-5.
- Edwards JC, Cooper C. (2006). Early environmental factors and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.*, **143**: 1-5.
- Ehrhard T, Kernbaum S. (1979). *Toxocara canis* et toxocarose humaine. *Bull Inst Pasteur*, **77**: 225-287.
- El NM, Wahib AA, Mangoud AM, El SA, Morsy AT. (2006). HCV/PCR positivity in bile and doudenal aspiration of fascioliasis and/or HCV patients. *J Egypt Soc Parasitol.*, **36**: 779-794.
- Elefant GR, Shimizu SH, Sánchez MC, Jacob CM, Ferreira AW. (2006). A serological follow-up of toxocariasis patients after chemotherapy based on the detection of IgG, IgA, and IgE antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Lab Anal.*, **20**: 164-172.

- Elliott De, Urban Jf, Argo Ck, Weinstock JV. (2000). Does the failure to acquire helminthic parasites predispose to Crohn's disease?. *FASEB J*, **14**: 1848–1855.
- Emad Y, Shehata M, Ragab Y, Saad A, Hamza H, Abou-Zeid A. (2010). Prevalence and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies for future development of rheumatoid arthritis in early undifferentiated arthritis. *Mod Rheumatol*, **20**: 358–365.
- Endenburg N, van Lith HA. (2010). The influence of animals on the development of children. *Vet J*. doi:10.1016/j.tvjl.2010.11.020
- Escalante H, Liñan R, Díaz E, Davelois K, Huamanchay O. (2005). Antígenos de larvas pulmonares de *Ascaris suum* reconocidos por anticuerpos producidos en *Oryctolagus cuniculus*. *Parasitol Latinoam*, **60**: 132–137.
- Espinoza JR, Maco V, Marcos L, Saez S, Neyra V, Terashima A, Samalvides F, Gotuzzo E, Chavarry E, Huaman MC, Bargues MD, Valero MA, Mas-Coma S. (2007). Evaluation of Fas2-ELISA for the serological detection of *Fasciola hepatica* infection in humans. *Am J Trop Med Hyg*, **76**: 977–982.
- Espinoza YA, Huapaya PE, Roldán WH, Jiménez S, Abanto EP, Rojas CA, Caverro YA, Gutiérrez CA. (2010). Seroprevalence of human toxocariasis in Andean communities from the Northeast of Lima, Peru. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **52**: 31–36.
- Fan CK, Su KE. (2004). Cross-reactions with *Ascaris suum* antigens of sera from mice infected with *A. suum*, *Toxocara canis*, and *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitol Int*, **53**: 263–271.
- Fenoy C, Cuéllar C, Águila C, Guillén L. (1992). Persistence de immuno response in human toxocariasis as measured by ELISA. *Int J Parasitol*, **22**: 1037–1038.
- Fenoy S, Cuéllar C, Guillén JL. (1996). Seroprevalence of toxocariasis in children and adults in Madrid and Tenerife, Spain. *J Helminthol*, **70**: 109–113.
- Fenoy S, Cuéllar C, Guillén JL. (1997). Serological evidence of toxocariasis in patients from Spain with a clinical suspicion of visceral larva migrans. *J Helminthol*, **71**: 9–12.
- Ferreira MU, Rubinsky-Elephant G, de Castro TG, Hoffmann EH, da Silva-Nunes M, Cardoso MA, Muniz PT. (2007). Bottle feeding and exposure to *Toxocara* as risk factors for wheezing illness among under-five Amazonian children: a population-based cross-sectional study. *J Trop Pediatr*, **53**: 119–124.
- Figuerola Pedrosa MM. (2003). Historia de la Artritis Reumatoide. En: Laffón Roca A, Gómez-Reino JJ. editores. **Artritis Reumatoide**. Drug Farma.
- Fillaux J, Santillan G, Magnaval JF, Jensen O, Larrieu E, Sobrino-Becaria CD. (2007). Epidemiology of toxocariasis in a steppe environment: the Patagonia study. *Am J Trop Med Hyg*, **76**: 1144–1147.
- Finkelman FD, Shea-Donohue T, Morris SC, Gildea L, Strait R, Madden KB, Schopf L, Urban JF Jr. (2004). Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunol Rev*, **201**: 139–155.

- Fleming J, Fabry Z. (2007). The hygiene hypothesis and multiple sclerosis [see Comment. *Ann Neurol.*, **61**: 85–89.
- Fleming JO, Cook TD. (2006). Multiple sclerosis and the hygiene hypothesis. *Neurology*, **67**: 2085–2086.
- Flohr C, Nguyen LN, Lewis S, Quinnell R, Minh TT, Liem HT, Campbell J, Pritchard D, Hien TT, Farrar J, Williams H, Britton J. (2006). Poor sanitation and helminth infection protect against skin sensitization in Vietnamese children: a cross-sectional study. *J Allergy Clin Immunol.*, **118**: 1305–1311.
- Fox DA. (2000). Cytokine blockade as a new strategy to treat rheumatoid arthritis: inhibition of tumor necrosis factor. *Arch Intern Med.*, **160**: 4437–4444.
- Friedmann E, Son H. (2009). The human-companion animal bond: how humans benefit. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, **39**: 293–326.
- Fullerton JK, Vitale M, Vitale GC. (2006). Therapeutic endoscopic retrograde cholangiopancreatography for the treatment of *Fasciola hepatica* presenting as biliary obstruction. *Surg Innov.*, **13**: 179–182.
- Gale EA. (2002). The rise of childhood type 1 diabetes in the 20th century. *Diabetes*, **51**: 3353–3361.
- Galushko EA, Erdes ShF, Bazorkina DI, Bol'shakova TIu, Vinogradova IB, Lesniak OM, Men'shikova LV, Miasoedova SE, Protopopova RN, Chernykh TM. (2010). Prevalence of rheumatoid arthritis in Russia (according to epidemiological findings). *Ter Arkh.*, **82**: 9–14.
- Geffray L. (1999). Infections associated with pets. *Rev Med Interne*, **20**: 888–901.
- Giacometti A, Cirioni O, Fortuna M, Osimani P, Antonicelli L, Del Prete MS, Riva A, D'Errico MM, Petrelli E, Scalise G. (2000). Environmental and serological evidence for the presence of toxocariasis in the urban area of Ancona, Italy. *Eur J Epidemiol.*, **16**: 1023–1026.
- Gil, A. Samartino L. (2002). Zoonosis en los Sistemas de Producción Animal de las Áreas Urbanas y Periurbanas de América Latina. Livestock Policy Discusión Paper N° 2. FAO.
- Gillespie SH, Bidwell D, Voller A, Robertson BD, Maizels RM. (1993). Diagnosis of human toxocariasis by antigen capture enzyme linked immunosorbent assay. *J Clin Pathol.*, **46**: 551–554.
- Glickman LT, Magnaval JF. (1993). Zoonotic roundworm infections. *Infect Dis Clin North Am.*, **7**: 717–732.
- Glickman LT, Schantz PM, Grieve RB. (1986). Toxocariasis. **Immunodiagnosis of parasitic diseases**. Vol 1. KW Walls et PM Schantz eds. Academic Press. New-York.
- Goffette S, Jeanjean AP, Duprez TP, Bigaignon G, Sindic CJ. (2000). Eosinophilic pleocytosis and myelitis related to *Toxocara canis* infection. *Eur J Neurol*, **7**: 703–706.

- Goldring SR. (2002). Bone and destruction in rheumatoid arthritis: what is really happening?. *J Rheumatology Suppl.*, **65**: 44-48.
- Gram IT, Riise T, Honda Y. (1997). Rheumatoid arthritis: a commonly misused diagnosis by the general population. *Clin Rheumatol.*, **16**: 264-266.
- Graña, J.; Fdez-López, C.; Carmona, L.; Sánchez-Meizoso, MO.; Díez-Morrondo, C.; Galdo, F. (2008). Evaluation of the International Criteria for Behçet's Disease in Spain. *Clin Exp Rheum.*, **26**: 14.
- Grencis RK, Cooper ES. (1996). Enterobius, trichuris, capillaria, and hookworm including ancylostoma caninum. *Gastroenterol Clin North Am.*, **25**: 579-597.
- Guay DR. (2001). Pet-assisted therapy in the nursing home setting: potential for zoonosis. *Am J Infect Control*, **29**: 178-186.
- Gueglio B, de-Gentile L, Nguyen JM, Achard J, Chabasse D, Marjolet M. (1994). Epidemiologic approach to human toxocariasis in western France. *Parasitol Res.*, **80**: 531-536.
- Gueglio B, Marjolet M. (1991). Les syndromes de Larva migrans. toxocariens: une impasse parasitaire bien cachée. *Bull Soc Fr. Parasitol.*, **9**: 171-181.
- Guerra A, Navarro C, de Guevara CL. (1995). Seroprevalence of toxocariasis in children and a case of VLM. *Eur J Epidemiol.*, **11**: 701-702.
- Habbari K, Tifnouti A, Bitton G, Mandil A. (1999). Helminthic infections associated with the use of raw wastewater for agricultural purposes in Beni Mellal, Morocco. *East Mediterr Health J.*, **5**: 912-921.
- Hanaoka R, Kasama T, Muramatsu M, Yajima N, Shiozawa F, Miwa Y, Negishi M, Ide H, Miyaoka H, Uchida H, Adachi M. (2003). A novel mechanism for the regulation of IFN-gamma inducible protein-10 expression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.*, **5**: 74-81.
- Hanvivatvong O, Tirawatnpong S, Kaowopas Y, Jitapankul S. (2003). Prevalence of autoantibodies in Thai elderly. *J Med Assoc Thai.*, **86**: 242-249.
- Harris ED Jr. (2005). Prednisolone in early rheumatoid arthritis: an antiinvasive effect. *Arthritis Rheum.*, **52**: 3324-3325.
- Haseeb AN, el-Shazly AM, Arafa MA, Morsy AT. (2002). A review on fascioliasis in Egypt. *J Egypt Soc Parasitol.*, **32**: 317-354.
- Haseeb AN, El-Shazly AM, Arafa MA, Morsy AT. (2003). Clinical, laboratory and ultrasonography features of proven human fascioliasis. *J Egypt Soc Parasitol.*, **33**: 397-412.
- Herrmann N, Glickman LT, Schantz PM, Weston MG, Domanski LM. (1985). Seroprevalence of zoonotic toxocariasis in the United States: 1971-1973. *Am J Epidemiol.*, **122**: 890-896.

- Hillyer GV, Soler de Galanes M, Rodríguez-Pérez J, Bjorland J, Silva de Lagrava M, Ramírez Guzmán S, Bryan RT. (1992). Use of the Falcon assay screening test--enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) and the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) to determine the prevalence of human fascioliasis in the Bolivian Altiplano. *Am J Trop Med Hyg.*, **46**: 603-609.
- Hotez PJ, Bottazzi ME, Franco-Paredes C, Ault SK, Periago MR. (2008) The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *Plos Negl Trop Dis.*, **2**: 300.
- Humbert P, Buchet S, Barde T. (1995). Toxocariasis. A cosmopolitan parasitic zoonosis. *Allerg Immunol (Paris)*, **27**: 284-291.
- Humbert P, Niezborala M, Salembier R, Aubin F, Piarroux R, Buchet S, Barale T. (2000). Skin manifestations associated with toxocariasis: a case-control study. *Dermatology*, **201**: 230-234.
- Iddawela RD, Rajapakse RP, Perera NA, Agatsuma T. (2007). Characterization of a *Toxocara canis* species-specific excretory-secretory antigen (TcES-57) and development of a double sandwich ELISA for diagnosis of visceral larva migrans. *Korean J Parasitol.*, **45**: 19-26.
- Inoue K, Inoue Y, Arai T, Nawa Y, Kashiwa Y, Yamamoto S, Sakatani M. (2002). Chronic eosinophilic pneumonia due to visceral larva migrans. *Intern Med.*, **41**: 478-482.
- Ishibashi H, Shinamura R, Hirata Y, Kudo J, Onizuka H. (1992). Hepatic granuloma in toxocaral infection. Role of ultrasonography in hypereosinophilia. *J Clinical Ultrasound*, **20**: 204-210.
- Jacquier P, Gottstein B, Stingelin Y, Eckert J. (1991). Immunodiagnosis of toxocarosis in humans: evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay kit. *J. Clin. Microbiol.*, **29**: 1831-1835.
- Jarosz W, Mizgajska-Wiktor H, Kirwan P, Konarski J, Rychlicki W, Wawrzyniak G. (2010). Developmental age, physical fitness and *Toxocara* seroprevalence amongst lower-secondary students living in rural areas contaminated with *Toxocara* eggs. *Parasitology*, **137**: 53-63.
- Jeanneret JP. (1991). Épidémiologie de la toxocarose dan la région jurassienne. Thèse d'état de sciences. Citada en: **Épidémiologie des maladies parasitaires**. 2. Helminthoses. (1996). Ch. Rippert. Ed. Médicales Internationales.
- Jiménez JF, Valladares B, Fernández-Palacios JM, de-Armas F, del-Castillo A. (1997). A serologic study of human toxocariasis in the Canary Islands (Spain): environmental influences. *Am J Trop Med Hyg.*, **56**: 113-115.
- Juris P, Breza M. (1988). Trials with the disinvasive efficiency of some disinfectants in the laboratory conditions. *Helminthologia*, **25**: 309-318.

- Kakihara D, Yoshimitsu K, Ishigami K, Irie H, Aibe H, Tajima T, Shinozaki K, Nishie A, Nakayama T, Hayashida K, Nakamuta M, Nawata H, Honda H. (2004). Liver lesions of visceral larva migrans due to *Ascaris suum* infection: CT findings. *Abdom Imaging*, **29**: 598-602.
- Kaplan M, Kamanli A, Kalkan A, Kuk S, Gülkesen A, Ardiçoğlu O, Demirdağ K. (2005). Toxocariasis seroprevalence in patients with rheumatoid arthritis. *Türkiye Parazitol Derg.*, **29**: 251-254.
- Kassai T. (1998). **Helmintología veterinaria**. Acribia (Ed.), Zaragoza (España).
- Kayes SG. (1997) Human toxocariasis and the visceral larva migrans syndrome: correlative immunopathology. *Chem Immunol.*, **66**: 99-124.
- Keiser J, Utzinger J. (2005). Emerging foodborne trematodiasis. *Emerg Infect Dis.*, **11**: 1507-1514.
- Kellgren JH, Lawrence JS. (1956). Rheumatoid arthritis in a population sample. *Ann Rheum Dis.*, **15**: 1-11.
- Kennedy MW, Foley M, Kuo YM, Kusel JR, Garland PB. (1987). Biophysical properties of the surface lipid of parasitic nematodes. *Mol Biochem Parasitol.*, **22**: 233-240.
- Kennedy MW, Tierney J, Ye P, McMonagle FA, McIntosh A, McLaughlin D, Smith JW. (1988). The secreted and somatic antigens of the third stage larva of *Anisakis simplex*, and antigenic relationship with *Ascaris suum*, *Ascaris lumbricoides*, and *Toxocara canis*. *Mol Biochem Parasitol.*, **31**: 35-46.
- Kim MS, Polychronakos C. (2005). Immunogenetics of type 1 diabetes. *Horm Res.*, **64**: 180-188.
- Kincekova J, Reiterova K, Dubinsky P. (1999). Larval toxocariasis and its clinical manifestation in childhood in the Slovak Republic. *J Helminthol.*, **73**: 323-328.
- Kinloch A, Lundberg K, Wait R, Wegner N, Lim NH, Zendman AJ, Saxne T, Malmström V, Venables PJ. (2008). Synovial fluid is a site of citrullination of autoantigens in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.*, **58**: 2287-2295.
- Kobayashi Y, Yasuba H, Kita H, Hamada K, Chihara J. (2004). Serum rheumatoid factor and peripheral blood eosinophil counts in patients with bronchial asthma. *Alerugi*, **53**: 1210-1215.
- Korsholm E. (1982). *Toxocara canis* as a cause of visceral larva migrans. Survival and development of eggs in the environment and potential ways of transmission to man: a review. *Nord Vet Med.*, **34**: 1-12.
- Kwon NH, Oh MJ, Lee SP, Lee BJ, Choi DC. (2006). The prevalence and diagnostic value of toxocariasis in unknown eosinophilia. *Ann Hematol.*, **85**: 233-238.

- Lalosević D, Oros A, Lalosević V, Knezević K, Knezević S, Bozić K, Vlajković K, Gebauer E. (2001). Manifestations of visceral and ocular symptoms of toxocariasis in a 6-year-old boy. *Med Pregl.*, **54**: 51-53.
- Lapin SV, Maslianskiĭ AL, Mazurov VI, Totolian AA. (2005). Comparative characteristics of specific autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Ter Arkh.*, **77**: 53-59.
- Lema-Gontad JM, Álvarez-Rivas N, Díez-Morrondo C, Pinto JA, Fernández-Sueiro JL, Fernández-López JC, Orebro N, González ME, Freire M, Atanes A, De Toro FJ, Graña G, Acasuso M, Galdo F. (2010). Descripción de una muestra de pacientes con espondiloartropatía en tratamiento biológico. *Reumatol Clin.*, **6**: 157.
- Ljungström I, van Knapen F. (1989). An epidemiological and serological study of *Toxocara* infection in Sweden. *Scand J Infect Dis.*, **21**: 87-93.
- Lomba C. (2001). Reconocimiento de complejos antigénicos de utilidad en el diagnóstico de infecciones parasitarias. **Memoria de Licenciatura**. Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Loukas A, Maizels RM. (1998). Cloning and characterisation of a prohibitin gene from infective larvae of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *DNA Seq.*, **9**: 323-328.
- Luime JJ, Colin EM, Hazes JM, Lubberts E. (2010). Does anti-mutated citrullinated vimentin have additional value as a serological marker in the diagnostic and prognostic investigation of patients with rheumatoid arthritis?. A systematic review. *Ann Rheum Dis.*, **69**: 337-344.
- Luo ZJ, Wang GX, Yang CI, Luo CH, Cheng SW, Liao L. (1999). Detection of circulating antigens and antibodies in *Toxocara canis* infection among children in Chengdu, China. *J Parasitol.*, **85**: 252-256.
- MacGregor AJ, Riste LK, Hazes JMW, Silman AJ. (1994). Low Prevalence of rheumatoid arthritis in Black-Caribbeans compared with whites in inner city Manchester. *Ann Rheum Dis.*, **53**: 293-297.
- Macpherson CN. (2005). Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses. *Int J Parasitol.*, **35**: 1319-1331.
- Magen E, Borkow G, Bentwich Z, Mishal J, Scharf S. (2005). Can worms defend our hearts? Chronic helminthic infections may attenuate the development of cardiovascular diseases. *Med Hypotheses.*, **64**: 904-909.
- Magnaval JF, Berry A, Fabre R, Morassin B. (2001). Eosinophil cathionic protein as a possible marker of active human *Toxocara* infection. *Allergy*, **56**: 1096-1099.
- Magnaval JF, Fabre R, Maurieres P, Charlet JP, De Larrard B. (1991). Application of the Western Blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitol. Res.*, **77**: 697-702.

- Magnaaval JF, Michault A, Calon N, Charlet JP. (1994). Epidemiology of human toxocariasis in La Réunion. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, **88**: 531-533.
- Maizels N, Weiner AM. (1993) in The RNA World, eds. Gesteland, R. F. & Atkins, J. F. (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY), pp. 577-602.
- Maizels RM, Yazdanbakhsh M. (2003). Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol.*, **3**: 733-744.
- Majithia V, Geraci SA. (2007). Rheumatoid arthritis: diagnosis and management. *Am J Med.*, **120**: 936-939.
- Majka DS, Deane KD, Parrish LA, Lazar AA, Barón AE, Walker CW, Rubertone MV, Gilliland WR, Norris JM, Holers VM. (2008). Duration of preclinical rheumatoid arthritis-related autoantibody positivity increases in subjects with older age at time of disease diagnosis. *Ann Rheum Dis.*, **67**: 801-807.
- Małafiej E, Spiewak E. (2001). The significance of the level of antibodies in the evaluation of the effects of treatment of toxocariasis. *Wiad Parazytol.*, **47**: 805-810.
- Marcos L, Maco V, Terashima A, Samalvides F, Espinoza JR, Gotuzzo E. (2005). Fascioliasis in relatives of patients with *Fasciola hepatica* infection in Peru. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **47**: 219-222.
- Marcos LA, Tagle M, Terashima A, Bussalleu A, Ramirez C, Carrasco C, Valdez L, Huerta-Mercado J, Freedman DO, Vinetz JM, Gotuzzo E. (2008). Natural history, clinicoradiologic correlates, and response to triclabendazole in acute massive fascioliasis. *Am J Trop Med Hyg.*, **78**: 222-227.
- Maruyama H, Nawa Y, Noda S, Mimori T, Choi WY. (1996). An outbreak of visceral larva migrans due to *Ascaris suum* in Kyushu, Japan. *Lancet*, **347**: 1766-1767.
- Mas-Coma MS, Esteban JG, Bargues MD. (1999). Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bull World Health Organ*, **77**: 340-346.
- Metter K, Glöser H, von Gaisberg U. (2000). Fascioliasis after a stay in Turkey. *Dtsch Med Wochenschr.*, **125**: 1160-1163.
- Mewar D, Wilson AG. (2006). Autoantibodies in rheumatoid arthritis: a review. *Biomed Pharmacother.*, **60**: 648-655.
- Miall WE. (1955). Rheumatoid arthritis in males. An epidemiological study of Walsh mining community. *Ann Rheum Dis.*, **14**: 150.
- Moal MC, Fauquert P, Youinou P, Lelong A, Le Goff P. (1990). Comparison of radiologic lesions of rheumatoid polyarthritis in function of the presence or the absence of the rheumatoid factor IgA. *Rev Rhum Mal Osteoartic.*, **57**: 613-617.
- Morrondo P, Díez-Morrondo C, Pedreira J, Díez-Baños N, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A, Díez-Baños P. (2006). *Toxocara canis* larvae viability after disinfectant-exposition. *Parasitol Res.*, **99**: 558-561.

- Musso C, Castelo JS, Tsanaclis AM, Pereira FE. (2007). Prevalence of *Toxocara*-induced liver granulomas, detected by immunohistochemistry, in a series of autopsies at a Children's Reference Hospital in Vitoria, ES, Brazil. *Virchows Arch.*, **450**: 411-417.
- Nadler SA, Hudspeth DSS. (2000). Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on three genes and morphology: hypotheses of structural and sequence evolution. *J. Parasitol.*, **86**: 380-393.
- Nair MG, Guild KJ, Artis D. (2006). Novel effector molecules in type 2 inflammation: lessons drawn from helminth infection and allergy. *J Immunol.*, **177**: 1393-1399.
- Nakamura-Uchiyama F, Tokunaga Y, Suzuki A, Akao N, Hiromatsu K, Hitomi S, Nawa Y. (2006). A case of *Ascaris suum* visceral larva migrans diagnosed by using *A. suum* larval excretory-secretory (ES) antigen. *Scand J Infect Dis.*, **38**: 221-224.
- Nansen P, Roepstorff A. (1999). Parasitic helminths of the pig: factors influencing transmission and infection levels. *Int J Parasitol.*, **29**: 877-891.
- Nathwani D, Laing RB, Currie PF. (1992). Covert toxocariasis-a cause of recurrent abdominal pain in childhood. *Br J Clin Pract.*, **46**: 271.
- Nejsum P, Parker ED Jr, Frydenberg J, Roepstorff A, Boes J, Haque R, Astrup I, Prag J, Skov Sørensen UB. (2005). Ascariasis is a zoonosis in Denmark. *J Clin Microbiol.*, **43**: 1142-1148.
- Nichols RI. (1956). The etiology of visceral larva migrans. I. Diagnostic morphology of second-stage infective *Toxocara* larvae. *J. Parasitol.*, **42**: 363-378.
- Niedfeld G, Pezzani B, Minvielle M, Basualdo Farjat JA. (1993). Presence of lipids in the secretory/excretory product from *Toxocara canis*. *Vet Parasitol.*, **51**: 155-158.
- Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, Van de Stadt RJ, Van der Horst-Bruinsma IE, De Koning MH, Habibuw MR, Vandenbroucke JP, Dijkmans BA. (2004). Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum.*, **50**: 380-386.
- Niemeyer, H. (1996). Living the life of a nematode. Pigs. Special Parasites, june: 8-9.
- Nikolaisen C, Rekvig OP, Nossent HC. (2005). Rheumatoid factor by laser nephelometry and Waaler-Rose assay: prognostic value in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.*, **34**: 269-276.
- Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G, Nakazawa T, Kawano S, Saigo K, Morinobu A, Koshiha M, Kuntz KM, Kamae I, Kumagai S. (2007). Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med.*, **146**: 797-808.
- Nokes C, Bundy DA. (1994). Does helminth infection affect mental processing and educational achievement?. *Parasitol Today*, **10**: 14-18.

- Nokes C, Grantham-McGregor SM, Sawyer AW, Cooper ES, Robinson BA, Bundy DA. (1992). Moderate to heavy infections of *Trichuris trichiura* affect cognitive function in Jamaican school children. *Parasitology*, **104**: 539-547.
- Nunes CM, Tundisi RN, Garcia JF, Heinemann MB, Ogassawara S, Richtzenhain LJ. (1997). Cross-reactions between *Toxocara canis* and *Ascaris suum* in the diagnosis of visceral larva migrans by western blotting technique. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **39**: 253-256.
- O'Neill SM, Parkinson M, Dowd AJ, Strauss W, Angles R, Dalton JP. (1999). Immunodiagnosis of human fascioliasis using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L1 cysteine proteinase. *Am J Trop Med Hyg.*, **60**: 794-751.
- O'Neill SM, Parkinson M, Strauss W, Angles R, Dalton JP. (1998). Immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* infection (fascioliasis) in a human population in the Bolivian Altiplano using purified cathepsin L cysteine proteinase. *Am J Trop Med Hyg.*, **58**: 417-423.
- Obwaller A, Duchêne M, Bruhn H, Steipe B, Tripp C, Kraft D, Wiedermann G, Auer H, Aspöck H. (2001). Recombinant dissection of myosin heavy chain of *Toxocara canis* shows strong clustering of antigenic regions. *Parasitol Res.*, **87**: 383-389.
- Olivares ME, Hernández RDF, Núñez-Álvarez CA, Cabiedes J. (2011). Proteínas citrulinadas en artritis reumatoide. *Reumatol Clin.*, **7**: 68-71.
- Oliveira CA, Germano PM. (1992). Presence of intestinal parasites in vegetables sold in the metropolitan region of São Paulo, SP, Brazil. I--Search of helminths. *Rev Saude Publica*, **26**: 283-289.
- Osoegawa M. (2004). Diagnosis and treatment of CNS parasite infection with special reference to parasitic myelitis. *Rinsho Shinkeigaku*, **44**: 961-964.
- Ouaissi MA, Auriault C, Santoro F, Capron A. (1981). Interaction between *Schistosoma mansoni* and the complement system: role of IgG Fc peptides in the activation of the classical pathway by schistosomula. *J Immunol.*, **127**: 1556-1559.
- Overgaauw PA. (1997). Aspects of *Toxocara* epidemiology: toxocarosis in dogs and cats. *Crit Rev Microbiol.*, **23**: 233-251.
- Page AP, Richards DT, Lewis JW, Omar HM, Maizels RM. (1991). Comparison of isolates and species of *Toxocara* and *Toxascaris* by biosynthetic labelling of somatic and ES proteins from infective larvae. *Parasitology*, **103**: 451-464.
- Panayi GS, V.M.Corrigan, et al (2001). Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Rheum. Dis Clin of North Am.*, **27**: 317-334.
- Pawlowski (2001). Toxocarosis in humans. Clinical expression and treatment dilemma. *J Helminthol.*, **75**: 229-305.
- Pawłowski ZS, Mizgajska H. (2002). Toxocariasis in Poznan region, Poland, in years 1990-2000. *Przegl Epidemiol.*, **56**: 559-565.

- Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Suárez JL, Pedreira J, Arias M, López C, Panadero R, Díaz P, Díez-Baños P, Morrondo P. (2003). Prevalence of natural ovine fasciolosis shown by demonstrating the presence of serum circulating antigens. *Parasitol Res.*, **91**: 328-331.
- Pearce EJ, Kane CM, Sun J. (2006). Regulation of dendritic cell function by pathogen-derived molecules plays a key role in dictating the outcome of the adaptive immune response. *Chem Immunol Allergy*, **90**: 82-90.
- Pegg EJ. (1971). Infection of dogs by *Toxocara canis* carried by flies. *Parasitology*, **62**: 409-414.
- Pérez C, Errázuriz I, Brockmann P, González S, Cofré C. (2003). Eosinophilic pneumonia caused by mesalazine. Report of one case. *Rev Med Chil.*, **131**: 81-84.
- Permin A, Henningsen E, Murrell KD, Roepstorff A, Nansen P. (2000). Pigs become infected after ingestion of livers and lungs from chickens infected with *Ascaris* of pig origin. *Int J Parasitol.*, **30**: 867-868.
- Perzanowski MS, Ng'ang'a LW, Carter MC, Odhiambo J, Ngari W, Vaughan JW, Chapman MD, Kennedy MW, Platts-Mills TA. (2002). Atopy, asthma, and antibodies to *Ascaris* among rural and urban children in Kenya: markers of allergy do not predict bronchial hyper-reactivity in a rural community. *J Pediatr.*, **140**: 582-588.
- Petithory JC, Beddok A, Quedoc M. (1994). Ascaridiasis zoonoses: visceral larva migrans syndromes. *Bull Acad Natl Med.*, **178**: 635-645.
- Phills JA, Harrold AJ, Whiteman GV, Perelmutter L. (1972). Pulmonary infiltrates, asthma and eosinophilia due to *Ascaris suum* infestation in man. *N Engl J Med.*, **286**: 965-970.
- Pietrapertosa D, Tulusso B, Gremese E, Papalia MC, Bosello SL, Peluso G, Petricca L, Michelutti A, Faustini F, Fedele AL, Ferraccioli G. (2010). Diagnostic performance of anti-citrullinated peptide antibodies for the diagnosis of rheumatoid arthritis: the relevance of likelihood ratios. *Clin Chem Lab Med.*, **48**: 829-834.
- Pinelli E, Brandes S, Dormans J, Gremmer E, van Loveren H. (2008). Infection with the roundworm *Toxocara canis* leads to exacerbation of experimental allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy*, **38**: 649-658.
- Pinto JA, Fdez-Sueiro JL, de Toro J, Atanes A, Graña J, Fdez-López C, Palmou N, Díez C, Galdo F, Blanco F. (2008). HLA-DRB1*03 y fallo en el tratamiento con Infliximab en pacientes con artritis reumatoide. *Reumatol Clin.*, **4**: 107.
- Poinar G, Boucot AJ. (2006). Evidence of intestinal parasites of dinosaurs. *Parasitology*, **133**: 245-249.
- Polderman AM, Vries H, Van de Water TP. (1980). Serological diagnosis of toxocariasis. The use of larval antigens in the ELISA. *Acta Leiden*, **48**: 37-42.
- Portus M, Riera C, Prats G. (1989). A serological survey of toxocariasis in patients and healthy donors in Barcelona (Spain). *Eur J Epidemiol.*, **5**: 224-227.

- Prestes-Carneiro LE, Souza DH, Moreno GC, Troiani C, Santarém V, Zago SC, Miguel NA, Freitas SB, Faria R, Martini L, Rubinsky-Elefant G, Iha A, Vaz AJ. (2009). Toxocariasis/cysticercosis seroprevalence in a long-term rural settlement, São Paulo, Brazil. *Parasitology*, **136**: 681-689.
- Prieto M. (1995). Desarrollo de *Toxocara canis* en perros Beagle infectados experimentalmente: respuesta inmunológica en los hospedadores y estudio de diversos parámetros serohematológicos y lesionales. **Tesis doctoral**. Faculdade de Veterinaria de Lugo. Universidade de Santiago de Compostela, pp. 360.
- Prociv P, Walker JC, Whitby M. (1992). Human ectopic fascioliasis in Australia: first case reports. *Med J Aust.*, **156**: 349-351.
- Radman NE, Archelli SM, Fonrouge RD, del V Guardis M, Linzitto OR. (2000). Human toxocarosis. Its seroprevalence in the city of La Plata. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **95**: 281-285.
- Rantapää-Dahlqvist S, De Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, Sundin U, Van Venrooij WJ. (2003). Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **48**: 2741-2749.
- Raptopoulou A, Sidiropoulos P, Katsouraki M, Boumpas DT. (2007). Anti-citrulline antibodies in the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis: evolving concepts. *Crit Rev Clin Lab Sci.*, **44**: 339-363.
- Rayes AA, Lambertucci JR (1999). The association between human toxocariasis and pyogenic abscesses. *Rev Soc Bras Med Trop.*, **32**: 425-438.
- Reckner Olsson A, Skogh T, Wingren G. (2001). Comorbidity and lifestyle, reproductive factors, and environmental exposures associated with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.*, **60**: 934-939.
- Renger F, Bang H, Feist E, Fredenhagen G, Natusch A, Backhaus M, Burmester GR, Egerer K. (2010). Immediate determination of ACPA and rheumatoid factor-a novel point of care test for detection of anti-MCV antibodies and rheumatoid factor using a lateral-flow immunoassay. *Arthritis Res Ther.*, **12**: 120.
- Richter J, Müller-Stöver I, Strothmeyer H, Göbels K, Schmitt M, Häussinger D. (2006). Arthritis associated with *Strongyloides stercoralis* infection in HLA B-27-positive African. *Parasitol Res.*, **99**: 706-707.
- Rindfleisch JA, Muller D. (2005). Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. *Am Fam Physician*, **72**: 1002-1004.
- Robertson BD, Burkot TR, Gillespie SH, Kennedy MW, Wambai Z, Maizels RM. (1988). Detection of circulating parasite antigen and specific antibody in *Toxocara canis* infections. *Clin Exp Immunol.*, **74**: 236-241.

- Robinson MW, Dalton JP. (2009). Zoonotic helminth infections with particular emphasis on fasciolosis and other trematodiasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, **364**: 2763-2776.
- Roepstorff, A. (1998). Natural *Ascaris suum* infections in swine diagnosed by coprological and serological (ELISA) METHODS. *Parasitol Res.*, **84**: 537-543.
- Roepstorff, A, Jorsal, SE (1989). Prevalence of helminth infections in swine in Denmark. *Vet Parasitol.*, **33**: 231-239.
- Roepstorff A, Nilsson O, O'Callaghan CJ, Oksanen A, Gjerde B, Richter SH, Ortenberg EO, Christensson D, Nansen P, Eriksen L, Medley GF. (1999). Intestinal parasites in swine in the Nordic countries: multilevel modelling of *Ascaris suum* infections in relation to production factors. *Parasitology*, **119**: 521-534.
- Rojo Vázquez FA, Ferre Pérez I. (1999). Parasitosis hepáticas. En: **Parasitología Veterinaria**. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, España. pp. 260-282.
- Roldán WH, Espinoza YA, Huapaya PE, Jiménez S. (2010). Diagnosis of human toxocarosis. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, **27**: 613-620.
- Rolff J. (2007). Why did the acquired immune system of vertebrates evolve?. *Dev Comp Immunol.*, **31**: 476-482.
- Rolland Y, Moreau J, Laroche M. (1998). Schistosomial arthritis. A case-report. *Rev Rhum Engl Ed.*, **65**: 597-598.
- Romasanta A, Romero JL, Arias M, Sánchez-Andrade R, López C, Suárez JL, Díaz P, Díez-Baños P, Morrondo P, Paz-Silva A. (2003). Diagnosis of parasitic zoonoses by immunoenzymatic assays—analysis of cross-reactivity among the excretory/secretory antigens of *Fasciola hepatica*, *Toxocara canis*, and *Ascaris suum*. *Immunol Invest.*, **32**: 131-142.
- Romeu J, Roig J, Bada JL, Riera C, Muñoz C. (1991). Adult human toxocariasis acquired by eating raw snails. *J Infect Dis.*, **164**: 438.
- Ropes MW, Bennet GA, Cobbs S, Jacos R, Jessar RA. (1956). Proposed diagnostic criteria for Rheumatoid arthritis. *Bull Rheum Dis.*, **7**: 121-124.
- Rubinsky-Elefant G, Hirata CE, Yamamoto JH, Ferreira MU. (2010) Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. *Ann Trop Med Parasitol.*, **104**: 3-23.
- Rugiero E, Cabrera ME, Ducach G, Noemi I, Viovy A. (1995). Toxocariosis sistémica en el paciente adulto. *Rev. Med. Chil.*, **123**: 612-616.
- Saba R, Korkmaz M, Inan D, Mamikoğlu L, Turhan O, Günseren F, Cevikol C, Kabaalioğlu A. (2004). Human fascioliasis. *Clin Microbiol Infect.*, **10**: 385-387.
- Sahatçiu-Meka V, Anton K. (2010). Laboratory examination of seronegative and seropositive rheumatoid arthritis. *Reumatizam*, **57**: 10-16.

- Sakai S, Shida Y, Takahashi N, Yabuuchi H, Soeda H, Okafuji T, Hatakenaka M, Honda H. (2006). Pulmonary lesions associated with visceral larva migrans due to *Ascaris suum* or *Toxocara canis*: imaging of six cases. *AJR Am J Roentgenol.*, **186**: 1697-1702.
- Sánchez-Andrade A, Suárez JL, Arias M, Francisco I, Díez C, Cortiñas J, Romasanta A, Morrondo P, Díez-Baños P, Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R. (2008). Relationships between eosinophilia, anti-Fasciola IgG, and IgM rheumatoid factors, in urban and rural areas of north-western Spain. *Ann Trop Med Parasitol.*, **102**: 489-498.
- Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A, Suárez J, Panadero R, Díez-Baños P, Morrondo P. (2000). Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). *Vet Parasitol.*, **93**: 39-46.
- Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A, Suárez JL, Panadero R, Pedreira J, López C, Díez-Baños P, Morrondo P. (2002). Influence of age and breed on natural bovine fasciolosis in an endemic area (Galicia, NW Spain). *Vet Res Commun.*, **26**: 361-370.
- Sánchez-Andrade, A. (2008). Estudio del factor reumatoide relacionado con agentes infecto-parasitarios. **Tesis Doctoral**. Universidad de Santiago de Compostela.
- Savigny DH. (1975). *In vitro* maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *J Parasitol.*, **61**: 781-782.
- Scrivener S, Yemaneberhan H, Zebenigus M, Tilahun D, Girma S, Ali S, McElroy P, Custovic A, Woodcock A, Pritchard D, Venn A, Britton J. (2001). Independent effects of intestinal parasite infection and domestic allergen exposure on risk of wheeze in Ethiopia: a nested case-control study. *Lancet*, **358**: 1493-1499.
- Scublinsky D, Venarotti H, Citera G, Messina OD, Scheines E, Rillo O, Arturi A, Hofman J, Somma LF, Casado G, Iannantuono RF, Gonzalez CD. (2010). The prevalence of rheumatoid arthritis in Argentina: a capture-recapture study in a city of Buenos Aires province. *J Clin Rheumatol.* **16**: 317-321.
- Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, van Venrooij WJ. (2000). The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.*, **43**:155-163.
- Schmidt G.D. (1992). Order Ascaridata. En: **Essentials of Parasitology**. MC Meyer; OW Olsevis. (Eds). WCB Publishers, Dubuque, IA, USA, pp: 154-157.
- Schneider C, Arnaud B, Schmitt-Bernard CF. (2000). Ocular toxocariasis. Value of local immunodiagnosis. *J F Ophthalmol.*, **23**: 1016-1019.
- Sebbag M, Simon M, Vincent C, Masson-Bessière C, Girbal E, Durieux JJ, Serre G. (1995). The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest.*, **95**: 2672-2679.

- Sellami H, Elloumi M, Cheikhrouhou F, Makni F, Baklouti S, Ayadi A. (2003). *Fasciola hepatica* infestation with joint symptoms. *Joint Bone Spine*, **70**: 71-72.
- Singwe-Ngandeu M, Finckh A, Bas S, Tiercy JM, Gabay C. (2010). Diagnostic value of anti-cyclic citrullinated peptides and association with HLA-DRB1 shared epitope alleles in African rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther.*, **12**: 36.
- Sloan T, Dooge D, Joyce P. (1991). Identification of phosphorylcholine containing antigens of *Fasciola hepatica*-successful tolerization against this epitope in experimental animals. *Parasite Immunol.*, **13**: 447-455.
- Smith H. (1991). Immune evasion and immunopathology in *Toxocara canis* infection. *Parasitic Nematodes*, 116-139.
- Smith P, Fallon RE, Mangan NE, Walsh CM, Saraiva M, Sayers JR, McKenzie, ANJ, Alcamí A, Fallon PG. (2005). *Schistosoma mansoni* secretes a chemokine binding protein with antiinflammatory activity, *J. Exp. Med.* **202**: 1319-1325.
- Sockalingam S, Khuan CS, Sthaneshwar P. (2009). Prevalence of anti cyclic citrullinated peptide antibodies in Malaysian rheumatoid arthritis patients and its correlation with disease activity. *Int J Rheum Dis.*, **12**: 211-215.
- Soulsby EJ. (1987). The evasion of the immune response and immunological unresponsiveness: parasitic helminth infections. *Immunol Lett.*, **16**: 315-320.
- Soulsby E.J.L. (1986). Helminths, Arthropods and Protozoa. of domesticated animals. 7th ed. London: Baillière & Tindall.
- Stastny P. (1978). HLA-D and Ia antigens in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, **21**: 139-143.
- Stewart TB, Hale OM. (1988). Losses to internal parasites in swine production. *J Anim Sci.*, **66**: 1 548-1 554.
- Strachan DP (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *Br Med J.*, **299**: 1259-60.
- Strauss W, O'Neill SM, Parkinson M, Angles R, Dalton JP. (1999). Short report: Diagnosis of human fascioliasis: detection of anti-cathepsin L antibodies in blood samples collected on filter paper. *Am J Trop Med Hyg.*, **60**: 746-748.
- Sullivan PW, Ghushchyan V, Huang XY, Globe DR. (2010). Influence of rheumatoid arthritis on employment, function, and productivity in a nationally representative sample in the United States. *J Rheumatol.*, **37**: 544-549.
- Summers RW, Elliott DE, Urban JF, [Thompson R](#), [Weinstock JV](#), (2005). Trichuris suis therapy in Crohn's disease. *Gut*, **54**: 87-90.
- Symmons DP. (2007). Classification criteria for rheumatoid arthritis--time to abandon rheumatoid factor?. *Rheumatology (Oxford)*, **46**: 725-726.
- Symons MC. (1969). Teaching and scientific research. *Nature*, **223**: 353-354.

- Taira K, Saeed I, Permin A, Kapel CM. (2004). Zoonotic risk of *Toxocara canis* infection through consumption of pig or poultry viscera. *Vet Parasitol.*, **121**: 115-124.
- Tawill S, Le Goff L, Ali F, Blaxter M, Allen JE. (2004). Both free-living and parasitic nematodes induce a characteristic Th2 response that is dependent on the presence of intact glycans. *Infect Immun.*, **72**: 398-407.
- Thomas K, Nixdorff U, Manger B, Geiler T, Lorenz HM, Faller G, Moshage W. (2000). Hypereosinophilia with myocardial involvement due to toxocariasis. Diagnosis of regional myocardial perfusion abnormalities by pulsed tissue Doppler echocardiography. *Med Klin.*, **95**: 163-167.
- Thomaz-Soccol V, Paulino RC, Castro EA, Andreoli CV. (1999). Helminth eggs viability in sewage and biosolids sludge in Curitiba, Paraná, Brazil. *Helm. Abstracts*. 68: 33. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, **40**: 829-36.
- Tokojima M, Ashitani J, Nakazato M. (2004). A case of eosinophilic pneumonia caused by visceral larva migrans due to *Ascaris suum*. *Kansenshogaku Zasshi*. **78**: 1036-1040.
- Toledo CI, De Armas F, Del Castillo A, Arévalo P, Pinero JE, Valladares B. (1994). Parasite contamination of parks and gardens as a public health problem. Data of the island of Tenerife. *Rev Sanid Hig Pública (Madr)*, **68**: 617-622.
- Trueba G, Guerrero T, Fornasini M, Casariego I, Zapata S, Ontaneda S, Vasco L. (2000). Detection of *Fasciola hepatica* infection in a community located in the Ecuadorian Andes. *Am J Trop Med Hyg.*, **62**: 518.
- Turhan O, Korkmaz M, Saba R, Kabaaalioglu A, Inan D, Mamikoglu L. (2006). Seroepidemiology of fascioliasis in the Antalya region and uselessness of eosinophil count as a surrogate marker and portable ultrasonography for epidemiological surveillance. *Infesz Med.*, **14**: 208-212.
- Uhlíková M, Hübner J, Kolárová L, Polácková M. (1996). Immunological studies on human larval toxocarosis. *Cent Eur J Public Health*, **4**: 242-245.
- Uhlíková M, Hübner J. (1998). Seroprevalence of *Toxocara canis* infection in Czech Republic. *Cent Eur J Public Health*, **6**: 195-198.
- Ulvestad E, Kanestrøm A, Madland TM, Thomassen E, Haga HJ. (2001). Clinical utility of diagnostic tests for rheumatoid factor. *Scand J Rheumatol.*, **30**: 87-91.
- Umeche N, Mandeh LE. (1991). *Musca domestica* as a carrier of intestinal helminthes in Calabar, Nigeeria. *East Afr Med J.*, **66**: 349-52.
- Van Boekel MA, Vossenaar ER, Van den Hoogen FH, Van Venrooij WJ. (2002). Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res.*, **4**: 87-93.
- Van den Biggelaar AH, Lopuhaa C, van Ree R, van der Zee JS, Jans J, Hoek A, Migombet B, Borrmann S, Luckner D, Kremsner PG, Yazdanbakhsh M. (2001). The prevalence of

- parasite infestation and house dust mite sensitization in Gabonese schoolchildren. *Int Arch Allergy Immunol.*; **126**: 231–238.
- Van den Biggelaar AH, Rodrigues LC, Van Ree R, Van der Zee JS, Hoeksma-Kruize YC, Souverijn JH, Missinou MA, Borrmann S, Kremsner PG, Yazdanbakhsh M. (2004). Long-term treatment of intestinal helminths increases mite skin-test reactivity in Gabonese schoolchildren. *J Infect Dis.*, **189**: 892–900.
- Van Knapen F, Buijs J, Kortbeek LM, Ljungström I. (1992). Larva migrans syndrome: *toxocara*, *ascaris*, or both? *Lancet*, **340**: 550–551.
- Van Roon JA, Bijlsma JW, Lafeber FP. (2006). Diversity of regulatory T cells to control arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.*, **20**: 897–913.
- [Vanparijs O](#), [Hermans L](#), [Van der Flaes L](#). (1991). Helminth and protozoan parasites in dogs and cats in Belgium. *Vet Parasitol.*, **38**: 67–73.
- Varbanova BB, Baleva M, Nikolov K, Mihailova D. (1999). Prevalence of IgM-, IgA- and IgG-rheumatoid factors in seronegative polyarticular disease compared to pauciarticular disease in juvenile chronic arthritis as measured by ELISA. *Adv Exp Med Biol.*, **455**: 61–68.
- Vázquez-Tsuji O, Martínez-Barbabosa I, Tay-Zavala J, Ruiz-Hernández A, Pérez-Torres A. (1997). Vegetables for human consumption as probable source of *Toxocara* sp. infection in man. *Bol Chil Parasitol.*, **52**: 47–50.
- Vercelli D. (2006). Mechanisms of the hygiene hypothesis—molecular and otherwise. *Curr Opin Immunol.*, **18**: 733–737.
- Verocai GG, Tavares PV, Ribeiro Fde A, Correia TR, Scott FB. (2010). Effects of disinfectants on *Toxocara canis* embryogenesis and larval establishment in mice tissues. *Zoonoses Public Health.*, **57**: e213–6. doi: 10.1111/j.1863-2378.2010.01330.x.
- Vervordeldonk MJ, Tak PD. (2002). Cytokines in rheumatoid arthritis. *Curr. Rheumatol Rep.*, **4**: 208–217.
- Visser H, Gelinck LB, Kampfraath AH, Breedveld FC, Hazes JM. (1996). Diagnostic and prognostic characteristics of the enzyme linked immunosorbent rheumatoid factor assays in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.*, **55**: 157–161.
- Vossenaar ER, Smeets TJ, Kraan MC, Raats JM, van Venrooij WJ, Tak PP. (2004). The presence of citrullinated proteins is not specific for rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum.*, **50**: 3485–3494.
- Walker SM, Shaham B, McCrudy DK, Wietting H, Arora YK, Hanson V, Bernstein B. (1990). Prevalence and concentration of IgM rheumatoid factor in polyarticular onset disease as compared to systemic or pauciarticular onset disease in active juvenile rheumatoid arthritis as measured by ELISA. *J Rheumatol.*, **17**: 936–940.

- Wardlaw AJ, Kay AB. (1987). The role of the eosinophil in the pathogenesis of asthma. *Allergy*, **42**: 321-335.
- Weinstock JV. (2006). Helminths and mucosal immune modulation. *Ann N Y Acad Sci.*, **1072**: 356-364.
- Welch JS, Symons MH, Dobson C. (1983). Immunodiagnosis of parasitic zoonoses. Purification of *Toxocara canis* antigens by affinity chromatography. *Int. J. Parasitol.*, **13**: 171-178.
- Wensley SP. (2008). Animal welfare and the human-animal bond: considerations for veterinary faculty, students, and practitioners. *J Vet Med Educ.*, **35**: 532-539.
- Wilder H. (1950). Nematode endophthalmitis. *Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.*, **55**: 99-109.
- Wolfe F, Cathey MA, Roberts FK. (1991). The latex test revisited. Rheumatoid factor testing in 8,287 rheumatic disease patients. *Arthritis Rheum.*, **34**: 951-960.
- Wolfe F. (1998). A comparison of IgM rheumatoid factor by nephelometry and latex methods: clinical and laboratory significance. *Arthritis Care Res.*, **11**: 89-93.
- Woodruff AW. (1970). Toxocariasis. *Br Med J.*, **3**: 663-669.
- Yamasaki H, Araki K, Lim PK, Zasmy N, Mak JW, Taib R, Aoki T. (2000). Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human toxocariasis. *J Clin Microbiol.*, **38**: 1409-1413.
- Young KA, Parrish LA, Zerbe GO, Rewers M, Deane KD, Michael Holers V, Norris JM. (2007). Perinatal and early childhood risk factors associated with rheumatoid factor positivity in a healthy paediatric population. *Ann Rheum Dis.*, **66**: 179-183.
- Zaccone P, Fehervari Z, Phillips JM, Dunne DW, Cooke A. (2006). Parasitic worms and inflammatory diseases. *Parasite Immunol.*, **28**: 515-523.
- Zacharasiewicz A, Auer H, Brath H, Stohlhofer B, Frank W, Aspöck H, Zwick H. (2000). *Toxocara* and bronchial hyperreactivity-results of a seroprevalence study. *Wien Klin Wochenschr.*, **112**: 922-926.
- Zarnowska-Prymek H. (2001). Enhancement of laboratory diagnosis specificity in human toxocariasis. *Wiad Parazytol.*, **47**: 489-496.
- Zhu J, Quyyumi AA, Norman JE, Csako G, Waclawiw MA, Shearer GM, Epstein SE. (2000). Effects of total pathogen burden on coronary artery disease risk and C-reactive protein levels. *Am J Cardiol.*, **85**: 140-146.
- Zisselman MH, Rovner BW, Shmueli Y, Ferrie P. (1996). A pet therapy intervention with geriatric psychiatry inpatients. *Am J Occup Ther.*, **50**: 47-51.
- Zwoliński J. (2000). The risk factors of *Toxocara canis* infestation in population of patients from the Lublin region. *Wiad Parazytol.*, **46**: 463-473.